

ALEXANDRE COUTINHO TEIXEIRA DE FREITAS

**IMUNOMODULAÇÃO COM O ANTICORPO MONOCLONAL
ANTI-CD45RB NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Giacomo Basadonna

COORDENADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos

CURITIBA

2000

Freitas, Alexandre Coutinho Teixeira de

Imunomodulação com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB no transplante de Ilhotas de Langerhans em camundongos / Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas.

- Curitiba, 2000.

ix, 153f.

Tese (doutorado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Tolerância imunológica. 2. Transplante. 3. Ilhotas de Langerhans 4. Anticorpo monoclonal. 5. Citometria de fluxo

Termo de Aprovação

Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

Imunomodulação com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB no transplante de Ilhotas de Langerhans em camundongos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Uili Coelho
Departamento de Cirurgia, UFPR

Co-orientador: Prof. Dr. Giacommo Basadonna
Departamento de Cirurgia, Universidade de Yale

Prof. Dr. Sérgio Brenner
Departamento Cirurgia, UFPR

Prof. Dr. Jorge Fouto Matias
Departamento Cirurgia, UFPR

Prof. Dr. Nicolau Gregori Czeczko
Departamento Cirurgia, Universidade Evangélica de Curitiba

Prof. Dr. Joaquim José Gama Rodrigues
Departamento Cirurgia, Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Sammir Rasslan
Departamento Cirurgia, Universidade de São Paulo

À minha esposa Diane, pelo constante apoio,
incentivo e compreensão, sem os quais esse
trabalho não poderia ter sido realizado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Júlio Cezar Uili Coelho, da Universidade Federal do Paraná, orientador deste trabalho,
pelos ensinamentos, pelo estímulo e pela influência marcante na minha formação acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Giacomo Basadonna, da Universidade de Yale,
co-orientador deste trabalho,
pelo acolhimento, pela amizade, pelos ensinamentos e pela oportunidade para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná,
pela orientação científica e teórico-prática durante minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná,
pelo auxílio, pelo estímulo e pela orientação na minha formação acadêmica.

Ao Dr. David Rothstein, da Universidade de Yale,
pelas idéias e pelo auxílio, fundamentais para a conclusão deste estudo.

Ao Dr. Scott Fecteau, da Universidade de Yale,
pela amizade, pelo auxílio constante e pelo estímulo intenso em todos os momentos.

À bióloga He-Yin Qiang, da Universidade de Yale,
pelo auxílio na análise histológica e na técnica de purificação de anticorpos.

Ao técnico de laboratório Xsiao Deng, da Universidade de Yale,
pelo auxílio no preparo das lâminas e do material fotográfico.

Ao Dr. Mohamed Sayegh, da Universidade de Harvard,
pela ajuda com hibridomas e pelo fornecimento de anticorpos monoclonais.

Ao Dr. Camilo Ricordi, da Universidade de Miami,
pela orientação técnica no transplante de ilhotas de Langerhans.

Ao técnico de laboratório Silvester Parker, da Universidade de Yale,
pelos ensinamentos de técnicas de laboratório.

À secretária Lorraine Roseman, da Universidade de Yale,
pelo estímulo constante e pelo grande suporte.

A CAPES,
pelo apoio a esta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 DIABETE MELITO E O PÂNCREAS	10
2.2 TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS	15
2.3 RESPOSTA IMUNE ALOGÊNICA	17
2.3.1 SINAL 1 DE ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA E A MOLÉCULA CD45	21
2.3.2 MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CD45	22
2.4 IMUNOMODULAÇÃO NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS	22
2.4.1 MODULAÇÃO DO SINAL 1 E DO SINAL 2 NA ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA	25
2.4.2 MODULAÇÃO DO SINAL 2	22
2.4.3 MODULAÇÃO DO SINAL 1	32
3 MATERIAL E MÉTODO	35
3.1 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	35
3.1.1 CULTURA DO HIBRIDOMA	35
3.1.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	36
3.1.3 PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	36
3.1.4 CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	37
3.1.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	38
3.1.6 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	39
3.1.6.1 Imunofluorescência indireta	40
3.1.6.2 Citometria de fluxo	42
3.2 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CTLA4	42
3.3 DIVISÃO DOS ANIMAIS	42
3.3.1 ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE	43
3.3.2 ANIMAIS NÃO-SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE	43
3.4 INDUÇÃO DE DIABETE QUÍMICA	44
3.5 TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS	44
3.5.1 PANCREATECTOMIA NOS DOADORES	44
3.5.2 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS	45

3.5.3	CONTAGEM DAS ILHOTAS DE LANGERHANS	46
3.5.4	TRANSPLANTE NO RECEPTOR	46
3.6	AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	49
3.6.1	AVALIAÇÃO DA GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO	49
3.6.2	SEGUIMENTO DOS ANIMAIS	49
3.6.2.1	Animais avaliados por citometria de fluxo	49
3.6.2.2	Isoenxertos	49
3.6.2.3	Aloenxertos sem tratamento	50
3.6.2.4	Aloenxertos tratados com anti-CD45RB	50
3.6.2.5	Aloenxertos tratados com anti-CTLA4	50
3.6.2.6	Aloenxertos tratados com anti-CD45RB e anti-CTLA4	50
3.7	AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E CITOMETRIA DE FLUXO	51
3.7.1	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	52
3.7.1.1	CD45RB e CTLA4 de superfície e CTLA4 e IgG de hamster intracelular	52
3.7.1.2	Anti-CD45RB C36316A+MB23G2 e anti-CD45RB MB23G2 residual	53
3.7.1.3	Marcadores de ativação linfocitária (CD25, CD44 e CD69)	54
3.7.2	CITOMETRIA DE FLUXO	55
3.7.2.1	Expressão de CD45RB, CTLA4 de superfície e CTLA4 e IgG de hamster intracelular	55
3.7.2.2	Expressão do anticorpo anti-CD45RB C36316A FITC+MB23G2	57
3.7.2.3	Expressão do anticorpo anti-CD45RB MB23G2 residual	58
3.7.2.4	Expressão dos marcadores de ativação linfocitária (CD25, CD44 e CD69)	58
3.8	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	59
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4	RESULTADOS	66
4.1	ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	66
4.1.1	ESPECTROFOTOMETRIA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB APÓS COLETA DA COLUNA PROTEÍNA G	66
4.1.2	ESPECTROFOTOMETRIA DA IgG PADRÃO E ANTI-CD45RB	66
4.1.3	RELAÇÃO DA ESPECTROFOTOMETRIA COM A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	67
4.1.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E CITOMETRIA DE FLUXO	68
4.2	INDUÇÃO DE DIABETE QUÍMICA	69
4.3	SOBREVIDA DOS ENXERTOS	69
4.3.1	PRIMEIRO TRANSPLANTE	69
4.3.2	SEGUNDO TRANSPLANTE	70
4.4	EXPRESSÃO DE CD45, CTLA4 E IgG DE HAMSTER	71
4.4.1	ANIMAIS NÃO-SUBMETIDOS A ENXERTO	71
4.4.2	ANIMAIS SUBMETIDOS A ENXERTO	74
4.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTI-CD45RB C36316A FITC + MB23G2	79

4.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPO RESIDUAL	79
4.7 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO CELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4	80
4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA	82
4.8.1 ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO	82
4.8.2 ANIMAIS QUE APRESENTARAM REJEIÇÃO	83
4.8.3 ANIMAIS AVALIADOS NO 120º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO	83
4.8.4 ANIMAIS AVALIADOS APÓS O 2º TRANSPLANTE (GRUPO III)	83
5 DISCUSSÃO	87
5.1 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	87
5.2 REVERSÃO DA HIPERGLICEMIA	88
5.3 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS	89
5.3.1 ISOENXERTOS	89
5.3.2 ALOENXERTOS SEM TRATAMENTO (GRUPO CONTROLE)	90
5.3.3 ALOENXERTOS TRATADOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	91
5.3.3.1 Primeiro transplante	91
5.3.3.2 Segundo transplante	91
5.3.4 ALOENXERTOS TRATADOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CTLA4	93
5.3.5 ALOENXERTOS TRATADOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB E ANTI- CTLA4	93
5.4 EXPRESSÃO DE CD45	95
5.5 EXPRESSÃO DE CTLA4	102
5.6 ANTICORPO ANTI-CD45RB RESIDUAL	104
5.7 INCUBAÇÃO CONJUNTA DE ANTI-CD45RB MB23G2 E C363.16A	105
5.8 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4	105
5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA	108
6 CONCLUSÃO	111
ANEXOS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE TABELAS

1	TITULAÇÃO DA IgG PADRÃO COM PBS 1%	38
2	TITULAÇÃO DE ANTI-CD45RB COM PBS 1%	38
3	FATOR DE CONVERSÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES DO ANTICORPO ANTI-CD45RB	39
4	DILUIÇÃO SERIADA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB EM SORO DE COELHO	41
5	INCUBAÇÃO DE ESLENÓCITOS E ANTICORPO ANTI-CD45RB	41
6	GRUPOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE	43
7	GRUPOS DE ANIMAIS NÃO-SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE	43
8	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA CD45, CTLA4 E IgG DE HAMSTER NO GRUPO I	52
9	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA CD45, CTLA4 E IgG DE HAMSTER NO GRUPO II	52
10	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA ANTI-CD45RB C36316A+MB23G2 E ANTI-CD45RB MB23G2 RESIDUAL NO GRUPO I	54
11	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA ANTI-CD45RB C36316A+MB23G2 E ANTI-CD45RB MB23G2 RESIDUAL NO GRUPO II	54
12	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA NO GRUPO I	54
13	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA NO GRUPO II	54
14	ESPECTROFOTOMETRIA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB APÓS COLUNA PROTEÍNA G	66
15	ESPECTROFOTOMETRIA DA IgG PADRÃO	67
16	ESPECTROFOTOMETRIA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB	67
17	CONCENTRAÇÃO DE ANTI-CD45RB	68
18	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E CITOMETRIA DE FLUXO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB	69

LISTA DE GRÁFICOS

1	1 RELAÇÃO DA IgG PADRÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE ANTI-CD45RB	67
2	PERCENTUAL CUMULATIVO DE SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS GRUPO I E II	69
3	PERCENTUAL CUMULATIVO DE SOBREVIVÊNCIA DOS ENXERTOS GRUPOS III, IV E V	70
4	EXPRESSÃO DE CD45RB NOS LINFÓCITOS T CD4 GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	71
5	EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE NOS LINFÓCITOS T CD4 COM CD45RB DE ALTO E BAIXO PM	72
6	EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4	73
7	EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4	73
8	EXPRESSÃO DE CD45RB EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO II (CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)	74
9	EXPRESSÃO DE CD45RB EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)	75
10	EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)	75
11	EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)	76
12	EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)	76
13	EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)	77
14	EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)	78
15	EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)	78
16	EXPRESSÃO DE ANTI-CD45RB (C36316A FITC)	79
17	EXPRESSÃO DE GAR-FITC (8º DIA)	80
18	EXPRESSÃO DE CD25 FITC - GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)...	81
19	EXPRESSÃO DE CD44 - GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	81
20	EXPRESSÃO DE CD69 FITC - GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB) ..	82

LISTA DE FIGURAS

1	TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS	48
2	CITOMETRIA DE FLUXO GRUPO I (CONTROLE) TUBOS 1 A 4	60
3	LINFÓCITOS T CD4	61
4	EXPRESSÃO DE CD45RB E CTLA4 DE SUPERFÍCIE (TUBOS 5 E 5') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	61
5	EXPRESSÃO DE CD45RB E CTLA4 INTRACELULAR (TUBOS 6 E 6') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	62
6	EXPRESSÃO DE CD45RB E IgG DE HAMSTER INTRACELULAR (TUBOS 7 E 7') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	62
7	EXPRESSÃO DE ANTI-CD45RB (MB23G2 + C36316A FITC) TUBOS 8 E 8' GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	63
8	EXPRESSÃO DE GAR FITC (TUBOS 9 E 9') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	63
9	CITOMETRIA DE FLUXO TUBOS 10 E 11 (GRUPO I CONTROLE)	64
10	EXPRESSÃO DE CD25 (TUBOS 12 E 12') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	64
11	EXPRESSÃO DE CD44 (TUBOS 13 E 13') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	65
12	EXPRESSÃO DE CD69 (TUBOS 14 E 14') GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)	65
13	CITOMETRIA DE FLUXO (IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA)	68
14	ANÁLISE HISTOLÓGICA NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO GRUPO II (CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)	85
15	ANÁLISE HISTOLÓGICA REJEIÇÃO - GRUPO II (CONTROLE)	85
16	ANÁLISE HISTOLÓGICA NO 120º PÓS-OPERATÓRIO (GRUPOS I E III) E 2º TRANSPLANTE (GRUPO III)	86

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-CD45RB	anticorpo monoclonal anti-CD45RB
Anti-CTLA4	anticorpo monoclonal anti-CTLA4
APC	células apresentadoras de antígenos
DAG	diacilglicerolquinase
ev	via endovenosa
FITC	fluoresceína conjugada com tiocianato
ip	via intraperitoneal
IP3	– inositol 1,4,5-trifosfato
LCA	antígeno leucocitário comum
MHC	complexo maior de histocompatibilidade
NFAT	fator nuclear de células T ativadas
PBS1%	solução salina tamponada com fosfato a 1%
PCR	reação em cadeia da polimerase
PKC	proteinoquinase C
PTK	proteintirosinoquinase
PTP	proteintirosinofosfatase
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
TCR	receptor da célula T
Th1	linfócito T auxiliador do tipo 1
Th2	linfócito T auxiliador do tipo 2

RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar a modulação do sistema imune com três doses do anticorpo monoclonal anti-CD45RB administradas no período peritransplante em modelo de aloenxerto de ilhotas de Langerhans de camundongos BALB-c sob a cápsula do rim esquerdo de camundongos C57BL-6 diabéticos por estreptozocina. Os animais foram divididos em 5 grupos: isoenxertos sem tratamento (grupo I, n=10); aloenxertos controle (grupo II, n=8); aloenxertos tratados com anti-CD45RB (grupo III, n=17); aloenxertos tratados com o anticorpo monoclonal anti-CTLA4 (grupo IV, n=8); aloenxertos tratados com anti-CD45RB e anti-CTLA4 (grupo V, n=13). Rejeição foi considerada quando a glicemia era maior que 200 mg/dl. Os animais que apresentaram rejeição e os dos grupos I e III que atingiram o 120º dia de pós-operatório foram nefrectomizados no lado esquerdo. Os animais do grupo III que apresentaram hiperglicemia após a nefrectomia no 120º dia de pós-operatório foram submetidos a 2º transplante com ilhotas de camundongos BALB/c ou CBA/H sob a cápsula do rim direito e nefrectomizados e sacrificados após 50 dias de funcionamento ou quando apresentaram rejeição. Todos os enxertos foram avaliados histologicamente por hematoxilina e eosina. Os enxertos dos animais dos grupos I e III no 120º dia de pós-operatório e do grupo III no 50º dia de pós-operatório do 2º transplante foram avaliados também por imuno-histoquímica para insulina. Três animais dos grupos II a V foram nefrectomizados à esquerda, esplenectomizados e sacrificados no 7º dia de pós-operatório. Os rins com os enxertos foram avaliados histologicamente por hematoxilina e eosina. Os leucócitos foram separados do restante do tecido esplênico, e os linfócitos T CD4 avaliados por citometria de fluxo quanto à expressão de CD45 e CTLA4. Todos os isoenxertos funcionaram até o 120º dia de pós-operatório. Os aloenxertos dos grupos II e IV apresentaram rejeição entre o 10º e o 15º dia. Sete aloenxertos do grupo III tratados com anti-CD45RB funcionaram até o 120º dia quando foram submetidos a um 2º transplante. Três dos 4 animais que receberam um 2º enxerto de camundongos BALB/c não apresentaram rejeição até o 50º dia e 3 animais que receberam um 2º enxerto de camundongos CBA/H apresentaram rejeição entre o 10º e o 15º dia. O aumento da sobrevida dos enxertos induzido pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB foi dependente dos estímulos negativos da molécula CTLA4, pois o bloqueio dessa molécula no grupo V causou rejeição entre o 15º e o 25º dia de pós-operatório em todos os animais. A análise histológica demonstrou infiltrado monomorfonuclear com destruição da arquitetura dos enxertos em todos os animais que apresentaram rejeição e infiltrado monomorfonuclear ao redor do enxerto sem invadir o seu interior nos animais dos grupos II, III, IV e V no 7º dia de pós-operatório, nos animais dos grupos I e III no 120º dia e nos animais do grupo III no 50º dia de pós-operatório do 2º transplante, nesses três últimos grupos com positividade para insulina na imuno-histoquímica. A análise por citometria de fluxo mostrou aumento do número de linfócitos T CD4 expressando CD45 de baixo peso molecular e CTLA4 intracelular e diminuição no número de linfócitos T CD4 apresentando CD45 de alto peso molecular nos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB em relação aos controles. Conclui-se que o predomínio de linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular e CTLA4 intracelular, que é regulador negativo da ativação linfocitária, está associado ao aumento da sobrevida dos enxertos e à indução de tolerância imunológica nos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB.

ABSTRACT

ANTI-CD45RB MONOCLONAL ANTIBODY IMMUNOMODULATION ON ISLETS OF LANGERHANS TRANSPLANTATION IN MICE

The aim of this study is to analyse the immunomodulation with 3 doses of anti-CD45RB monoclonal antibody given in the peritransplant period of BALB/c mice islets of Langerhans allografts under the left kidney capsule of streptozocin induced C57BL-6 diabetic mice. There were 5 groups of mice: isografts with no treatment (group I, n=10); allografts with no treatment (group II, n=8); allografts treated with anti-CD45RB (group III, n=17); allografts treated with the monoclonal antibody anti-CTLA4 (group IV, n=8); allografts treated with anti-CD45RB and anti-CTLA4 (group V, n=13). Glucose levels higher than 200 mg/dl were considered rejection. Animals with rejection of the grafts and group I and III animals with no rejection after 120 days of the transplant were nephrectomized on the left side. Hyperglycemic group III animals after the nephrectomy at 120 days were transplanted again with BALB/c or CBA/H mice islets under the capsule of the right kidney and, after 50 days or when presented with rejection, they were nephrectomized on the right side and sacrificed. All grafts were analysed with hematoxylin and eosin. Group I and III grafts working after 120 days and group III grafts 50 days after the 2^o transplantation were analysed also with immunohistochemistry for insulin. Three animals on groups II to V were esplenectomized, nephrectomized and sacrificed 7 days after the transplant. The kidneys containing the grafts were analyzed with hematoxylin and eosin. Leukocytes were separated from the splenic tissue and CD45 and CTLA4 expression were determined on CD4 T cells with flow cytometry. All isografts were working after 120 days. Group II and IV animals rejected the grafts after 10 to 15 days. Half of group III allografts were working after 120 days when they were submitted to the second transplantation. Three of the 4 animals that received a 2nd BALB/c graft didn't presented rejection until 50 days after the transplantation and the 3 animals that received a CBA/H graft presented rejection after 10 to 15 days. Anti-CD45 induced increased graft survival depended on negative CTLA4 molecule signals since CTLA4 blockade on group V caused rejection on all animals after 15 to 25 days. Histology showed destruction of the architecture of the islets with a mononuclear cell infiltrate in all rejected grafts and a perislet mononuclear cell infiltrate with no islet invasion on groups II, III, IV and V 7 days after the transplantation, group I and III grafts 120 days after the 1st transplant and group III grafts 50 days after the 2nd transplant, the 3 last groups with positive insulin staining on immunohistochemistry. Flow cytometry showed an increased number of CD4 T cells expressing CD45RB of low molecular weight with intracellular CTLA4 and a decreased number of CD4 T cells expressing CD45RB of high molecular weight on animals of group III in relation to the controls. In conclusion, the increased number of CD4 T cells expressing CD45RB of low molecular weight with intracellular CTLA4, a negative regulator of T lymphocyte activation, is associated with the increased survival and tolerance induction on animals treated with anti-CD45RB monoclonal antibodies.

1 INTRODUÇÃO

Diabete melito é uma patologia que nos Estados Unidos acomete 6% da população, ou seja, cerca de 15 milhões de pessoas (STRATA et al., 1996). A síndrome da diabete melito inclui não somente o metabolismo inadequado da glicose, mas também complicações microvasculares que caracterizam a doença como a maior responsável por insuficiência renal crônica, amputação de membro inferior e cegueira em adultos.

BANTING et al. (1922) foram os primeiros a utilizar a insulina contida em extratos do pâncreas de animais para o tratamento da diabete, acreditando-se na época que esse avanço iria extinguir a morbimortalidade imposta pela doença. Após meio século, a acidose diabética quase desapareceu como causa de morte e os pacientes portadores de diabete juvenil tiveram pela primeira vez a perspectiva de atingir a vida adulta. No entanto, desde o início de sua utilização, dúvidas surgiram de que a diabete seria curada pela administração de insulina. Sabe-se atualmente que, apesar do cuidadoso controle com insulina e dieta, a deterioração de artérias de pequeno calibre observada em pacientes diabéticos progride inexoravelmente em muitos deles (LILLEHEI et al., 1970). Essa doença arterial, apesar de ocorrer em todo o organismo, tem predileção pelo rim e retina e caracteriza-se pelo espessamento da membrana basal. Como resultado, com 30 anos de idade, quase 75% dos pacientes portadores de diabete juvenil apresentam significativa retinopatia ou nefropatia, não importando o quão cuidadosamente foram tratados.

O transplante do pâncreas estabelece total controle do metabolismo glicêmico, tornando insulino-independentes os pacientes diabéticos e melhorando-lhes a sobrevida (FARNEY e SUTHERLAND, 1993; ROBERTSON et al., 1999). É ainda benéfico na prevenção de complicações crônicas, como o espessamento da membrana basal e redução no espaço mesangial (SUTHERLAND, 1996); na recorrência da nefropatia diabética nos rins transplantados (BOHAN et al., 1987; BILOUS et al. 1989); na

normalização da velocidade da condução nervosa e em outras manifestações neurológicas (VAN DER VLIET et al., 1988; KENNEDY et al., 1990) e na estabilização da retinopatia (COUET et al., 1985; SUTHERLAND, 1996). O transplante de pâncreas e rim em pacientes diabéticos torna a sobrevida após 10 anos equivalente à de não-diabéticos submetidos somente a transplante renal (CANTAROVICH et al., 1999). No entanto o transplante é um procedimento complexo, que ainda apresenta muitas limitações devido a sua significativa morbidade e mortalidade (SUTHERLAND, 1996). Fatores complicadores são a carência de órgãos, a necessidade de imunossupressão inespecífica e sua restrição quase que exclusiva a pacientes com nefropatia diabética com necessidade de transplante simultâneo de rim e pâncreas, sendo os dois órgãos provenientes geralmente do mesmo doador (SUTHERLAND, 1996).

Poucos pacientes diabéticos não-portadores de nefropatia são submetidos ao procedimento, devido ao risco imposto pela imunossupressão. Como consequência, o transplante de pâncreas é realizado tardiamente na história natural da diabetes melito insulino-dependente.

O transplante de ilhotas de Langerhans é a opção terapêutica ideal (SUTHERLAND et al., 1978; SUTHERLAND, 1991; SUTHERLAND, 1996). O procedimento cirúrgico é simples e é possível sua realização precoce no decurso da diabetes melito, antes da ocorrência de complicações irreversíveis. Estudos experimentais em animais já demonstraram seus bons resultados com mínima ou nenhuma imunossupressão.

Entre 1990 e 1993, 75 transplantes de ilhotas de Langerhans foram realizados para o tratamento de diabetes tipo I em 34 instituições em todo o mundo e notificados ao Registro Internacional de Transplante de Ilhotas de Langerhans (HERING et al., 1995). No entanto somente 17 pacientes permaneceram insulino-independentes por pelo menos 1 semana e somente 8 (11%) por mais de 1 ano. A análise desses dados indica que a maioria dos casos de falência do enxerto se deveu a rejeição, como ocorreu em outras séries (ALEJANDRO et al., 1987; ALEJANDRO et al., 1997; ALEJANDRO et al., 1999; JINDAL et al., 1999).

O regime imunossupressor habitual é feito com prednisona, ciclosporina e azatioprina associadas a indução com preparados antilinfocíticos, como anticorpos monoclonais anti-CD3, globulina antilinfocítica ou globulina antitimocítica. As novas drogas disponíveis no armamentário terapêutico, como tacrolímus e micofenolatomofetil, não apresentaram vantagem em termos de sobrevida do enxerto (ALEJANDRO et al., 1999); outras, como anticorpos monoclonais anti-CD25 (receptor para interleucina 2) e bloqueadores do ciclo celular como o sirolímus, ainda estão em investigação (ALEJANDRO et al., 1999).

Os regimes imunossupressores atualmente disponíveis são inespecíficos e têm como alvo os linfócitos T em suas fases precoces de ativação (SUTHANTHIRAN e STROM, 1994). A ciclosporina e o tacrolímus previnem a produção de citocinas críticas para a proliferação dos linfócitos T, como a interleucina 2 (SCHREIBER e CRABTREE, 1992). O sirolímus atua na transdução do sinal no receptor para interleucina 2 através do bloqueio da progressão do ciclo celular (CHUNG et al., 1992). A azatioprina e o micofenolatomofetil, ambos inibidores da síntese de purinas, inibem a proliferação dos linfócitos T (BRAZELTON e MORRIS, 1996). Os anticorpos monoclonais antilinfócitos T, como o OKT3, atuam depletando os linfócitos e bloqueando o seu receptor (NORMAN, 1995).

A rejeição a um aloenxerto ocorre porque o genoma dos mamíferos contém diversos *loci* polimórficos que codificam uma grande variedade de antígenos teciduais (SAYEGH e TURKA, 1998). Os indivíduos que não expressam determinado alelo nesses *loci* reconhecem a proteína codificada por ele como estranha ao seu organismo, do que decorre uma vigorosa resposta imune. Os genes mais importantes estão no complexo maior de histocompatibilidade (MHC). As moléculas transcritas a partir do MHC são expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas. Sua função habitual é ligar-se a fragmentos de peptídios antigênicos derivados de microorganismos invasores e “apresentá-los” aos linfócitos T, que os reconhecem através de seus receptores (TCR). Esse reconhecimento é o passo inicial para a resposta imune mediada pelos linfócitos T. Os órgãos transplantados expressam nas

APCs as moléculas transcritas a partir do MHC do doador, que ativam linfócitos do receptor ligando-se ao receptor da célula T (TCR), iniciando o processo de rejeição aguda (LECHLER et al., 1990; VELLA et al., 1997; CIUBOTARIU et al., 1998). Os linfócitos T CD4, também chamados de linfócitos T auxiliares, desempenham o papel mais importante nesse processo. Após sua ativação, produzem linfocinas que atuam de maneira autócrina nos próprios linfócitos CD4 e de maneira parácrina em linfócitos T CD8, em macrófagos e em linfócitos B (KRIEGER et al., 1996), desencadeando uma resposta semelhante à reação de hipersensibilidade tardia (KRIEGER et al., 1996).

Novas técnicas foram desenvolvidas recentemente para se evitar a rejeição, com destaque à indução de tolerância imunológica, que se caracteriza pelo funcionamento em longo prazo de um aloenxerto na ausência de imunossupressão, associado ao funcionamento de um segundo enxerto proveniente da mesma linhagem de doadores (TRAN et al., 1994; STEURER et al., 1995; ROSSINI et al., 1996; TRAN et al., 1997; BASADONNA et al., 1998; RASTELINI et al., 1999a; ZHENG et al., 1999). Essas novas técnicas atuam em fases mais precoces da ativação dos linfócitos T do que o fazem as drogas imunossupressoras inespecíficas: a) interação das moléculas do MHC das APCs do doador com o TCR dos linfócitos do receptor, chamada sinal 1 de ativação linfocitária (modulada pelo receptor CD45); b) interação de moléculas coestimuladoras da ativação linfocitária das APCs do doador (CD40, B7-1, B7-2 e ICAM) com as moléculas coestimuladoras dos linfócitos T do receptor (CD40L, CD28, CTLA4 e LFA 1), chamada sinal 2 ou coestimulatório.

Nos últimos anos, diversas drogas vêm sendo pesquisadas com resultados encorajadores (SAYEGH e TURKA, 1998). Entre elas destacam-se a imunoglobulina CTLA4 (LINSLEY et al., 1991a; LENSCHOW et al., 1992; TURKA et al., 1992); o anticorpo monoclonal anti-CD40L (HANCOCK et al., 1993; LARSEN et al., 1996; PARKER et al., 1995); os anticorpos monoclonais anti-B7-1 e anti-B7-2 (LENSCHOW et al., 1995); o anticorpo monoclonal anti-LFA-1 (CHAHINE et al., 1994). Outro anticorpo monoclonal que apresentou resultados satisfatórios na indução de tolerância a aloenxertos foi o anti-CD45RB (BASADONNA et al., 1998).

OBJETIVO

Os objetivos deste estudo são:

- 1) verificar o efeito na sobrevivência dos aloenxertos de ilhotas de Langerhans em camundongos diabéticos tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB;
- 2) verificar a capacidade de o anticorpo monoclonal anti-CD45RB induzir tolerância imunológica;
- 3) analisar a dependência da ação do anticorpo monoclonal anti-CD45RB no receptor de membrana CD45, componente do sinal 1 de ativação linfocitária, em relação à molécula CTLA4, componente do sinal 2;
- 4) analisar o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD45RB na expressão da molécula de membrana CD45 em linfócitos T CD4;
- 5) analisar o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD45RB na expressão da molécula CTLA4 em linfócitos T CD4.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETE MELITO E PÂNCREAS

O papiro de Ebers (1550 a.C.) contém a primeira referência histórica à diabetes. Entre inúmeras outras doenças, descreve-se ali um estado de poliúria muito semelhante ao da diabetes melito e também o seu tratamento, que consistia na ingestão de um extrato líquido de ossos, trigo, grãos, terra e areia (MACFARLANE et al., 1997). A associação de poliúria com uma substância de gosto adocicado na urina foi pela primeira vez descrita na literatura sânscrita (600 a.C.) por dois médicos indianos, Susruta e Charuka. Médicos japoneses e chineses, na mesma época, descreveram um estado de poliúria associado com urina de gosto adocicado que atraía cães; o tratamento prescrito incluía evitar vinho, produtos de cereais e atividades sexuais. Aretaeus da Capadócia (200 a.C.) foi o primeiro a usar o termo “diabetes”, como descrição genérica de condições que causavam poliúria; no entanto atribuiu a doença a um defeito nos rins. Avicena (1000 d.C.) escreveu uma vasta enciclopédia médica que incluía acurada descrição das características clínicas da diabetes, com menção a duas complicações da doença: gangrena e disfunção sexual. O tratamento recomendado era uma mistura de lúpulo com certas sementes, que de fato têm alguma atividade hipoglicêmica (MCFARLANE et al., 1997).

WILLIS (1675) realizou a primeira publicação no Ocidente sobre o gosto adocicado da urina de diabéticos. Nela descreve a diabetes como uma doença não tão rara como referida em publicações anteriores, para cujo tratamento prescreve restrição alimentar.

DOBSON (1776) publicou uma série de experimentos, demonstrando que, além da urina, o soro de diabéticos também apresentava uma substância de sabor adocicado, na realidade o açúcar o qual se formaria primariamente no soro e não nos rins.

ROLLO (1797) foi o primeiro a usar o adjetivo “melito” (do grego “mel”) para distinguir a doença de outra condição poliúrica sem glicosúria (diabete insípida). Também descreveu a catarata diabética e o odor de acetona (que relacionou com maçãs) na respiração de alguns pacientes. Prescrevia como tratamento uma dieta rica em carne e pobre em carboidrato, suplementada com componentes anoréticos, como antimônio, ópio e digitais. Esse regime diminuiria a glicemia e melhoraria os sintomas da doença em alguns pacientes.

William Prout incluiu o coma entre as complicações da diabete. Noyes observou que uma forma de retinite ocorria em pacientes glicosúricos (MC FARLANE et al., 1997). KUSSMAUL (1874) descreveu a cetoacidose diabética.

Apesar de a diabete melito ser patologia conhecida há séculos, sua correlação com o pâncreas e as ilhotas de Langerhans é descoberta relativamente recente na história da medicina. Segundo BUSNARDO et al. (1983), na Antigüidade os gregos foram os primeiros a reconhecer o pâncreas como um órgão distinto, mesmo não conhecendo sua função. Galeno citou vagamente o órgão e não se sabe se Hipócrates o associou com alguma doença. A primeira descrição do pâncreas é atribuída ao pai da anatomia científica, Herophilus de Chalcedon (ano 300 a.C.). Rufus de Ephesus (ano 100 d.C.) denominou de pâncreas o órgão (*pan*: todo; *kreas*: carne), provavelmente devido à ausência de estrutura óssea ou cartilagem.

SINGER (1957) cita Andreas Versalius, no século XVI, como o primeiro a definir o pâncreas como glândula, em seu tratado *Fábrica do Corpo Humano*. Segundo BRUNSCHWIG (1937), Versalius desconhecia o sistema ductal pancreático e atribuía ao órgão a função de proteger o estômago. Johann George Wirsung, em 1642, descreveu o ducto principal do pâncreas (BRUNSCHWIG, 1937). Ainda no século XVII, Thomas Warton, em um estudo de todos os tecidos glandulares do corpo humano, notou a semelhança entre a estrutura do pâncreas e a das glândulas submandibulares (METTLER, 1947). Em 1797 o anatomista alemão Von Siebold publicou uma tese sobre o aparelho salivar, na qual a glândula parótida, a submaxilar, a sublingual e o pâncreas foram considerados constituintes do mesmo sistema (WHIPPLE, 1942). Pesquisando as

secreções do pâncreas em cães, foi possível a Franciscus de Le Boe (também conhecido por Sylvius) observar a importância do órgão na digestão. Coube a seu aluno Regnier de Graaf, com base na análise das secreções pancreáticas colhidas de um marinheiro morto em acidente, demonstrar a sua semelhança com os achados dos estudos em cães.

Albrecht Von Haller, no século XVIII, observou que o ducto pancreático entra no duodeno em conjunto com o ducto biliar, sugerindo ter a secreção pancreática a função de diluir a bile (BUSNARDO et al., 1983). Em 1742 Santorini ilustrou o ducto pancreático acessório (BUSNARDO et al., 1983).

A função pancreática na digestão, entretanto, antes apenas vislumbrada, só no século XIX começou a ser entendida, graças aos estudos de Claude Bernard. Ele demonstrou que o suco pancreático emulsifica os alimentos gordurosos, decompondo-os em glicerina e ácidos graxos; tem ação proteolítica sobre as proteínas e converte amido em açúcar (BUSNARDO et al., 1983). Também desenvolveu as técnicas de ligadura do ducto pancreático, demonstrada posteriormente por outros autores como causa de degeneração do tecido exócrino, com preservação do endócrino.

Langerhans, que ainda estudante de Medicina publicara um artigo descrevendo as ilhotas (LANGERHANS, 1867), publicou em 1869 uma tese intitulada *Contribuição da Anatomia Microscópica do Pâncreas* (LANGERHANS, 1869); nesses estudos, com auxílio de técnicas de transiluminação e secções de tecido analisadas com corantes, ele descreveu a estrutura das ilhotas. Em 1882 Kuhne descreveu a rede de capilares ao redor das ilhotas (BROE et al., 1981).

VON MERING e MINKOWSKI (1890) foram os primeiros a demonstrar que a remoção cirúrgica do pâncreas em cães é seguida de diabetes geralmente fatal. Motivado por um debate entre os dois pesquisadores, esse experimento visava verificar se um cão sobreviveria a uma pancreatectomia total. Foi um funcionário do laboratório que notou que a urina dos cães pancreatectomizados atraía moscas, em contraste com a dos cães não-pancreatectomizados. Essa foi a primeira associação entre a mais antiga doença endócrina humana descrita, com o seu sítio de origem. Desde então aumentou o interesse pelo pâncreas como órgão de função endócrina.

Laguesse, em 1893, descreveu em detalhes as características histológicas das ilhotas preservadas em pâncreas atrofiados após a ligadura do ducto de Wirsung, denominando-as “ilhotas de Langerhans”; concluiu ainda que elas são responsáveis pela secreção endócrina pancreática (BENSLEY, 1911).

Segundo sugeriu Schaefer em 1895, as ilhotas de Langerhans estariam lesadas em portadores de diabetes (BENSLEY, 1911).

Diamare em 1899 e Schulze em 1900 demonstraram que as ilhotas de Langerhans contêm pelo menos duas variedades celulares, às quais Lane, em 1907, denominou células A e B (BENSLEY, 1911). Schulze demonstrou ainda que após a ligadura do ducto de Wirsung as ilhotas permaneciam intactas, em contraste com a atrofia do resto do parênquima.

A existência de corpos hialinos nas ilhotas de Langerhans de pacientes diabéticos, descrita por Eugene Opie em 1901, fornecia evidências sobre a sua atuação na doença (BUSNARDO et al., 1983).

Moses Barron, de Minnesota, em um artigo intitulado *A Relação das Ilhotas de Langerhans com a Diabetes com Referência Especial aos Casos de Litíase Pancreática* evidencia que as ilhotas estão associadas à etiologia da diabetes e que esta não existe nas doenças pancreáticas em que não há o envolvimento das ilhotas (BUSNARDO et al., 1983).

MEYER (1909) deu o nome de “insulina” (do latim *insula*: ilha) ao hormônio que diminui os níveis de glicose sanguínea, cuja existência na época era hipotética e cuja produção ele atribuía às ilhotas de Langerhans.

BANTING e BEST (1922) foram os primeiros a isolar a insulina. Na Universidade de Toronto eles extraíram “isletina” do pâncreas de um cão que tivera seu ducto pancreático ligado 10 semanas antes. Essa substância foi injetada em outro cão, em coma diabético devido a uma pancreatectomia prévia, o qual em pouco tempo se recuperou e começou a deambular. Curiosamente a análise das anotações de Frederic Banting indicam que inicialmente ele explorou a possibilidade do transplante de ilhotas de Langerhans purificadas isoladas de cães com o ducto pancreático ligado, abandonou no

entanto essa linha de pesquisa, o que veio a resultar no isolamento da insulina (BRUNSCHWIG, 1937).

O uso da insulina exógena aumentou muito a sobrevida de pacientes diabéticos, mas não evitou que a doença continuasse a apresentar significativa morbidade e mortalidade. Como não foi obtido com a insulina completo controle da diabete, outras modalidades terapêuticas continuaram a ser pesquisadas, com destaque para o transplante de tecido pancreático.

2.2 TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS

O transplante de órgãos, atualmente rotina como opção terapêutica no tratamento de diversas doenças, tem sua primeira referência no procedimento realizado pelos médicos e santos Cosme e Damião no século III d.C. (MULLER-RUCHHOLTZ, 1999): eles trataram um paciente branco removendo-lhe uma das pernas e transplantando nele a perna de um paciente negro morto no mesmo dia. Outro episódio clássico foi o do Papa Inocêncio VIII, que, no ano de 1492, na tentativa de obter rejuvenescimento tomou o sangue coletado de três meninos; os meninos faleceram e o papa aparentemente não se beneficiou com seu ato, morrendo no mesmo ano.

Desde o fim do século passado, inúmeros investigadores vieram tentando realizar enxertos pancreáticos em mamíferos. Inicialmente os experimentos utilizavam o órgão inteiro e somente em um pequeno número de casos tiveram sucesso comprovado através de testes funcionais e histológicos. O crescente avanço das pesquisas culminou com os bons resultados atuais do transplante de pâncreas em humanos.

Numa fase intermediária, iniciaram-se estudos para viabilizar o transplante de fragmentos de tecido pancreático de animais – fetos, recém-nascidos e adultos. Paralelamente, as técnicas de isolamento de ilhotas de Langerhans puras, sem o componente exócrino do tecido pancreático, foram sendo aperfeiçoadas até se chegar ao primeiro transplante realizado em ratos.

Pode-se dizer que a história dos enxertos pancreáticos se iniciou com Minkowski, em 1892, com o objetivo de tratar a diabetes em um modelo de diabetes cirúrgica em cães (COUPLAND, 1960): ele transplantou o pâncreas no tecido subcutâneo da parede abdominal usando um pedículo vascular. Não foi observada nenhuma melhora nos níveis glicêmicos.

BENSLEY (1911) foi o primeiro a reportar o isolamento de ilhotas de Langerhans em um estudo sobre sua morfologia realizado em porcos-da-guiné. Após o sacrifício do animal, o pâncreas era distendido com corante vermelho neutro por infusão através da aorta, ficando imediatamente com coloração rosada – as ilhotas de Langerhans se destacavam do resto do tecido por ficarem coradas de vermelho. À medida que o corante evaporava, inicialmente do tecido exócrino, as ilhotas se desprendiam, podendo ser isoladas e analisadas por microscopia óptica.

Em 1912 Pratt e Murphy relataram seu insucesso na tentativa de realizar em cães um enxerto pancreático com pedículo vascular na circulação esplênica (COUPLAND, 1960).

Tampouco obtiveram sucesso Hédon (1913), Houssay e Molinelli (1927) e La Barre (1927) em experimentos com enxertos pancreáticos ortotópicos em cães diabéticos, pois não conseguiram demonstrar nenhuma diminuição nos níveis glicêmicos (GAYET e GUILLAUMIE, 1927).

GAYET e GUILLAUMIE (1927) realizaram transplante de pâncreas em cães submetidos previamente a uma pancreatectomia total, no qual o órgão foi anastomosado à circulação carótida e jugular. Esse foi o primeiro experimento que resultou em diminuição significativa da glicemia sanguínea, mesmo que apenas durante 6 horas. Em 1936, Bottin, também em experimento com anastomose do pâncreas na circulação carótido-jugular, obteve níveis normais de glicemia durante 7 dias (COUPLAND, 1960).

SELLE (1935) usou fragmentos de pâncreas fetal canino mantidos em meio de cultura ou tecido pancreático obtido do pâncreas de cães adultos após ligadura do ducto pancreático principal para transplantá-los no tecido subcutâneo axilar ou na virilha de

ções pancreatectomizados. No entanto não observou nenhuma evidência de atividade insulínica e os enxertos foram reabsorvidos completamente em 3 semanas.

BROWNING e RESNIK (1952) publicaram os resultados de seus experimentos em camundongos normoglicêmicos e diabéticos em que transplantaram tecido pancreático na câmara anterior do olho, na região subcapsular esplênica e no tecido subcutâneo; foram usados pâncreas de embriões, de recém-nascidos e de adultos. Os autores não tiveram a preocupação de separar o tecido endócrino do exócrino. No caso de homoenxertos na câmara anterior do olho, observaram sobrevida indefinida do tecido, porém sem repercussão na glicosúria de camundongos diabéticos; nesses animais os ácinos pancreáticos tornaram-se cistos. Nos aloenxertos observaram absorção do tecido em 3 semanas, ocorrendo o mesmo em todos os transplantes posicionados abaixo da cápsula do baço. Os transplantes de tecido pancreático de recém-nascidos colocados no tecido subcutâneo apresentaram sobrevida indefinida e redução nos níveis de glicosúria em 66% dos casos.

DUBOIS e GONET (1960) injetaram fragmentos pancreáticos de fetos de ratos no testículo de ratos albinos diabéticos pela injeção de aloxan; os níveis hiperglicêmicos dos receptores regrediram em 48 horas. Em experimento subsequente injetaram extrato dos testículos dos animais transplantados nos testículos de ratos normais, causando coma hipoglicêmico e morte em 2 horas.

COUPLAND (1960) transplantou tecido pancreático fetal de ratos na câmara anterior do olho de ratos adultos: o tecido dos fetos foi transplantado para a mãe para diminuir os índices de rejeição. Nos enxertos que persistiram mais de 1 ano, o tecido pancreático constituía-se quase que exclusivamente de ilhotas de Langerhans.

HOUSE et al. (1962) relataram alotransplantes de tecido pancreático de hamsters recém-nascidos no tecido subcutâneo da face de hamsters adultos diabéticos pela injeção de aloxan. Informaram que obtiveram reversão dos níveis hiperglicêmicos, porém não fornecem no artigo os resultados em longo prazo.

HELLERSTROM (1964), num experimento em camundongos com o intuito de obter ilhotas de Langerhans para estudos metabólicos, introduziu o uso do microscópio de dissecação como parte da técnica de isolamento.

MOSKALEWSKI (1965), realizando estudos sobre a morfologia das ilhotas de Langerhans em porcos-da-guiné, foi o primeiro a utilizar a enzima collagenase para separar o tecido exócrino pancreático. Após a pancreatectomia, o órgão foi seccionado com tesoura até ser reduzido aos menores fragmentos possíveis, que foram lavados com solução salina balanceada de Hanks e incubados a 37°C em solução contendo a enzima. A seguir, as ilhotas foram isoladas manualmente com o auxílio de um microscópio de dissecação. Devido à ação da enzima, o tecido exócrino foi desprendido facilmente do endócrino. A utilização da collagenase foi um avanço que permitiu a obtenção de ilhotas de Langerhans em número suficiente para tornar possível o transplante livre do tecido acinar responsável pelas secreções exócrinas.

LACY e KOSTIANOVSKY (1967) introduziram o método de distensão do pâncreas com solução salina balanceada de Hanks através de canulação do ducto biliar comum, para o isolamento de ilhotas de Langerhans em ratos Wistar, com a finalidade de estudos bioquímicos. O órgão distendido foi excisado e colocado em um frasco com solução de collagenase, no qual foi seccionado em pequenos pedaços e incubado a 37°C durante 20 minutos. Na seqüência, o material foi lavado oito vezes com solução salina balanceada de Hanks e as ilhotas isoladas manualmente com o auxílio de microscópio óptico.

O primeiro transplante de ilhotas de Langerhans realizado em ratos por YOUNOSZAI et al., (1970) marca o início da era moderna no que respeita a seu uso para enxertos (SUTHERLAND, 1981), embora os níveis glicêmicos dos animais tenham permanecido normais por curto período de tempo e todos tenham apresentado rejeição. Os transplantes de fragmentos pancreáticos até então experimentados não tinham mostrado resultados satisfatórios.

Deve-se a BALLINGER e LACY (1972) o primeiro transplante de ilhotas de Langerhans com bons resultados em longo prazo, num estudo realizado em ratos Lewis.

Foram eles também os primeiros a utilizar o isolamento das ilhotas do resto do tecido pancreático através do método de gradiente de densidade com o uso da solução de Ficoll®. O experimento consistiu em isoenxertos entre ratos Lewis e em aloenxertos com ratos Wistar como doadores e ratos Lewis como receptores (neste grupo foi usada imunossupressão com azatioprina). Diabetes química foi induzida com estreptozocina. Quatrocentas a seiscentas ilhotas foram transplantadas na cavidade peritoneal ou no músculo da coxa. Ao final do experimento (3 meses), os animais receptores apresentavam níveis normais de glicemia; os aloenxertos foram avaliados durante somente 5 semanas e nesse período 50% dos animais permaneceram euglicêmicos.

PANIJAYANOND et al. (1973) realizaram experimento semelhante em camundongos, em cuja cavidade peritoneal enxertaram ilhotas de Langerhans, conseguindo normalização dos níveis glicêmicos. Resultados igualmente satisfatórios foram obtidos por RECKARD et al. (1973) e LORENZ et al. (1975) em experimentos com ratos.

KEMP et al. (1973) demonstraram que o mesmo número de ilhotas que é parcialmente eficaz na reversão dos níveis glicêmicos quando transplantadas na cavidade peritoneal é totalmente efetivo se transplantadas no fígado através de injeção na veia porta. Conjeturaram os autores que isso se devia ao suprimento sanguíneo, que é imediatamente disponível no território portal.

GOTOH et al. (1985), relatando transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos, descreveram o método de digestão intraductal através da injeção de solução de collagenase pelo ducto biliar comum para a distensão do pâncreas. Essa inovação técnica permitiu o isolamento de um maior número de ilhotas por pâncreas.

Diversos autores realizaram o implante das ilhotas em outros sítios: no tecido subcutâneo de ratos e camundongos (HELMKE et al., 1975; KRAMP et al., 1976; NELKEN et al., 1977); no tecido intramuscular (KEMP et al., 1973; KONCZ et al., 1976); no intratesticular (FERGUSON e SCOTHORNE, 1973); no intrapancreático e nas glândulas salivares (GEORGAKAIS, 1979); abaixo da cápsula renal (BOWEN et al., 1980; REECE-SMITH et al., 1981; TOLEDO-PEREYRA et al., 1984; KANAI et al.,

1989; POSSELT et al., 1990; FUKUZAKI et al., 1991; FABIAN et al., 1992; KAUFMAN et al., 1992; HAO et al., 1992; FUKUZAKI et al., 1993; COULOMBE et al., 1994; CHAHINE et al., 1994; LENSCHOW et al., 1995; STEURER et al., 1995; SHAPIRO e LIU, 1995; PARKER et al., 1995; ROSSINI et al., 1996; COULOMBE et al., 1996; ZHENG et al., 1997; TRAN et al., 1997; GAINER et al., 1997; AUERSVALD et al., 1997; BASADONNA et al., 1998; ZHENG et al., 1999); no ventrículo cerebral (TZE et al., 1984); na circulação pulmonar, por embolização (SLIJEPCEVIC et al., 1975); intratímico (POSSELT et al., 1990); no baço, através de injeção via artéria esplênica (FELDMAN et al., 1977; FINCH et al., 1977; RECKARD et al., 1977; FRANKLIN et al., 1979; ANDERSON, 1979); no fígado, através de injeção na veia porta (FAUSTMAN et al., 1981; SHIZURU et al., 1987; POSSELT et al., 1990; HAO et al., 1992; ASAKURA et al., 1997).

2.3 RESPOSTA IMUNE ALOGÊNICA

GORER (1937) demonstrou pela primeira vez a resposta imune do organismo a um tecido transplantado. Foram realizados transplantes de tecido tumoral (sarcoma) entre diferentes linhagens de camundongos, observando-se nos receptores a formação de anticorpos capazes de aglutinar hemácias do sangue de camundongos da mesma espécie que os doadores.

Com a comprovação por MEDAWAR (1944) de que o processo de rejeição a transplantes é um evento imunológico, diversas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de controlar essa reação.

DEMPSTER et al. (1950) demonstraram o prolongamento da sobrevida de enxertos de pele em coelhos submetidos a radioterapia. Os mesmos efeitos foram observados por BILLINGHAM et al. (1951) utilizando corticosteróides e por MEEKER et al. (1959) utilizando 6-mercaptopurina também em enxertos de pele em coelhos. CALNE e MURRAY (1961) aumentaram a sobrevida de enxertos renais em cães com a

utilização da azatioprina. MARCHIORO et al. (1964) verificaram em estudos experimentais a ação sinérgica da azatioprina com a prednisona, drogas que também STARZL et al. (1964) utilizaram em transplantes renais em humanos, precipitando uma revolução na área de transplante de órgãos.

Essa linha de ação de provocar imunossupressão vem sendo adotada até os dias de hoje com o desenvolvimento de novas drogas, como a ciclosporina, que se tornou disponível clinicamente no fim da década de 70 (CALNE et al., 1979) e o FK 506 (STARZL et al., 1989).

BILLINGHAM (1953) foi o primeiro a induzir um estado de tolerância imunológica a transplante. Fetos de camundongos foram imunizados intra-útero com uma suspensão de tecido de camundongos adultos de outra linhagem. Com oito semanas de vida os animais foram submetidos a enxerto de pele proveniente de camundongos da mesma linhagem que os doadores do tecido para imunização e não apresentaram rejeição. Esse estudo confirmou uma das predições feitas por Burnet e Fenner em 1949, de que a exposição de animais a antígenos antes do desenvolvimento do sistema imune poderia promover a tolerância imunológica.

SNELL (1957) demonstrou a importância da presença de células de origem linfóide no tecido doado, para a iniciação da resposta imune no receptor.

BRETSCHER e COHN (1970) propuseram o modelo de ativação linfocitária através de dois sinais. Atualmente a maioria das terapias pesquisadas para induzir tolerância a aloenxertos têm sua base nesse modelo, originalmente descrito para explicar a discriminação do sistema imune entre tecido próprio e não-próprio e baseado na existência de antígenos não-expressos ou encontrados no timo. Para a proliferação de um clone de linfócitos T específicos a um determinado antígeno, a APC deve estimular o linfócito T através de dois sinais independentes: a) sinal 1, quando o próprio antígeno ligado às moléculas da classe II do MHC na membrana da APC se liga ao TCR; b) sinal 2, quando moléculas coestimuladoras presentes na membrana da APC se ligam a outros receptores do linfócito T. A presença isolada do sinal 1 induz a célula a um estado de anergia ou apoptose, não se verificando a expansão clonal linfocitária específica ao

antígeno. Essa é a base do mecanismo para reconhecimento de um tecido próprio e de um não-próprio durante a fase de desenvolvimento do organismo. Linfócitos T precursores específicos de um determinado antígeno reconhecido como próprio do organismo que desencadeariam uma resposta auto-imune são induzidos a um estado de anergia no momento em que são apresentados a esse antígeno no timo por APCs que expressam em suas membranas os antígenos de classe II do MHC (sinal 1) porém não expressam as moléculas necessárias para o sinal de coestimulação (sinal 2). Processo semelhante induz os linfócitos auto-reativos à morte celular programada (apoptose) quando expostos aos antígenos no estroma da medula óssea (NAGATA, 1997). A presença isolada do sinal coestimulatório (sinal 2) não desencadeia nenhuma resposta linfocitária. Esses achados foram comprovados por inúmeros experimentos subseqüentes (LAFERTY e CUNNINGHAM, 1975; PAETKAU et al., 1976; LAFFERTY et al., 1978; LAFFERTY, 1980). Segundo HOLLANDER et al. (1999), esse mecanismo assegura irresponsividade do sistema imune aos antígenos próprios do organismo – um estado funcional denominado tolerância central

LAFERTY et al. (1975) observaram que antígenos de tecidos de origem não-hematopoética não são capazes de induzir resposta imune celular *in vivo*, a não ser que células hematopoéticas viáveis estejam presentes e funcionem como provedoras da atividade coestimulatória. A partir desse trabalho, o modelo de ativação linfocitária através de dois sinais começou a ser alvo de estudos para indução de tolerância a aloenxertos.

2.3.1 SINAL 1 DE ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA E A MOLÉCULA CD45

O sinal 1 na ativação linfocitária, referindo-se à interação do antígeno expresso nas moléculas transcritas a partir do MHC na membrana das APCs com o receptor da célula T (TCR) nos linfócitos T, é modulado pelo grupo de proteintirosinofosfatases (PTPs) CD45 que regulam a atividade das proteintirosinoquinases (PTKs) presentes na porção citoplasmática do TCR (BASADONNA et al., 1998).

Reif e Allen, em 1963, identificaram pela primeira vez a glicoproteína CD45 durante a caracterização imunológica das moléculas de superfície dos leucócitos, com base em sua antigenicidade (TROWBRIDGE, 1991). Essa mesma molécula, também identificada por Boyse e Old em 1969, inicialmente chamou a atenção devido à sua abundância (ocupa cerca de 10% da superfície celular), à sua distribuição exclusiva em leucócitos e à sua estrutura distinta (TROWBRIDGE, 1991).

TROWBRIDGE e MAZAUSKAS (1976) denominaram-na LCA (antígeno leucocitário comum) ou T200, significando sua presença em linfócitos T e ao peso molecular de aproximadamente 200.000 quilodáltons. Embora essas características sugerissem uma função importante, havia poucas evidências diretas relacionando-a com as respostas linfocitárias a antígenos (FARBRE e WILLIAMS, 1977; DALCHAU et al., 1980).

CHABORNNEAU et al. (1988) determinaram a similaridade da seqüência citoplasmática de aminoácidos da CD45 com a proteintirosinofosfatase (PTP) placentária 1B. TONKS et al. (1988) confirmaram a atividade da CD45 como PTP e desta determinaram duas classes: transmembranosa (CD45) e citoplasmática (PTB 1B placentária).

A associação de fosfato com proteína já é conhecida desde o século XIX; em 1906 descobriu-se que essa associação ocorre por uma ligação covalente e em 1933 o primeiro fosfoaminoácido foi isolado de uma proteína (HUNTER e COOPER, 1985). Desde então uma grande variedade de ligações covalentes de fosfato com proteínas foram demonstradas, as mais comuns envolvendo esterificação de fosfato com serina e treonina. A descrição de fosfato esterificado com tirosina foi realizada por Eckhart em 1979 (HUNTER e COOPER, 1985). CARPENTER et al., em 1979, foram os primeiros a observar a atividade de uma proteintirosinofosfatase em membranas de células A431 e células mutantes pela ação do vírus Rous causador de sarcoma (FISCHER et al., 1991). Em 1980 Hunter demonstrou que nos animais todas as células contêm baixos níveis de fosfotirosina (HUNTER e COOPER, 1985). A fosfotirosina não fora reconhecida anteriormente devido à grande quantidade de fosfotreonina, que mascarava sua presença.

A existência de fosfotirosina de maneira estável e reversível implica a presença de uma ou mais proteinoquinasas capazes de fosforilar, e também a de uma proteinofosfatase capaz de defosforilar a tirosina.

Nos últimos anos uma grande variedade de sistemas foram descritos envolvendo a fosforilação de tirosina. Seis genes celulares já foram identificados codificando proteintirosinoquinasas (PTKs) e há indicações da existência de muitos outros (HUNTER e COOPER, 1985). Algumas PTKs foram purificadas e extensivamente caracterizadas; além disso tiveram demonstrada a sua capacidade de fosforilar substratos não-protéicos, como o fosfatidilinositol (HUNTER e COOPER, 1985). Bishop, em 1987, demonstrou que a fosforilação da tirosina é implicada no controle do crescimento e proliferação de células normais e neoplásicas (FISHER et al., 1991). A transdução de alguns sinais através da membrana celular é mediada pela fosforilação da tirosina e depende do balanço enzimático entre as PTKs e PTPs (HUNTER, 1989; WEISS, 1993; KOZIERADZKI et al., 1997). Nos linfócitos T e B a transdução de sinais e a resposta biológica mediada por receptores de superfície antígeno-específicos necessitam da expressão da PTP transmembranosa CD45.

Segundo estudos de PINGEL e THOMAS (1989), não existe proliferação celular ou produção de citocinas em resposta a um antígeno em linfócitos T CD4 mutantes que não expressem CD45 em sua membrana, o que os levou a definir a CD45 como reguladora positiva do crescimento celular, indispensável para a proliferação de linfócitos estimulados por antígeno.

KORETZKY et al. (1991) demonstraram que células leucêmicas Jurkat CD4+, deficientes em CD45, não respondem com aumento da fosforilação da tirosina, geração de derivados do inositol ou produção de interleucina 2 após estímulo com anticorpos monoclonais anti-TCR ou anti-CD2

Segundo KLAUSNER e SAMELSON (1991), a fosforilação da tirosina é o evento intracelular mais precoce após o estímulo do receptor do linfócito T. O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T é mediado pelo complexo do TCR e resulta no

início de uma reação em cadeia que induz a expressão de produtos de genes cruciais para a ativação linfocitária e para o início da resposta imune.

BARBER et al. (1989) demonstraram que a PTK p56lck está ligada à porção citoplasmática do receptor CD4 linfocitário. Segundo GAUEN et al. (1992), a PTK p59fyn também está ligada à porção citoplasmática do receptor CD4 e a uma das cadeias do TCR.

KORETSKI et al. (1992) demonstraram que a expressão de CD45 é necessária para o aumento da fosforilação da tirosina intracelular dependente das PTKs p59fyn e p56lck e da concentração intracelular de cálcio e para a geração de fosfatases derivadas do inositol em resposta a um estímulo com anticorpos monoclonais anti-CD3.

Segundo DEANS et al. (1992), o mesmo ocorre após a ativação do linfócito T CD4 através da interação do antígeno ligado ao MHC das células apresentadoras de antígenos e o TCR. As PTKs p59fyn e p56lck normalmente se encontram fosforiladas no linfócito T em repouso. Esse estado de fosforilação determina uma conformação estrutural à enzima, na qual a sua porção ativa não é acessível ao seu substrato. Logo, após a ativação do linfócito T, a PTB CD45 defosforila as PTKs, tornando-as ativas e iniciando a cascata de reações que irá terminar com a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula e determinar a produção de interleucinas. As PTKs p59fyn e p56lck ativadas ativam por sua vez a PTK ZAP70, formando um complexo de PTKs ancoradas na porção citoplasmática do TCR. Os substratos para essas PTKs são a enzima fosfolipase C γ , que ativada produz DAG (diacilglicerolquinase) e IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato), e as enzimas Vav e Shc, que irão ativar a proteína de ligação entre receptor e efector Ras. Esses substratos determinam três vias de ativação de fatores de transcrição: a primeira é a ativação da PKC (proteinoquinase C) pelo DAG, que por sua vez irá ativar mensageiros secundários, lipídios e fosfolipídios ativos como fatores de transcrição; a segunda é o aumento da concentração citoplasmática de cálcio determinado pelo IP3, ativando a fosfatase calciocalmodulina, sensível a calcineurina, que por sua vez ativa o fator de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas); a terceira é a ativação de uma cascata de serino e treoninoquinases pela proteína de ligação Ras, que se

inicia com a enzima Raf1, continua com a ativação sequencial das quinases MEK, MAP e p90rsk e por fim ativa fatores de transcrição (WEISS et al., 1993). Essa cadeia de reações é sensível a modificações na expressão de CD45 e de outras proteínas na membrana celular componentes do TCR ou dos sinais coestimulatórios (sinal 2).

Atualmente só existem evidências de qual seria o ligante natural da molécula CD45. Alguns autores consideram a molécula CD22 esse ligante natural (STAMENKOVIC et al., 1991; TROWBRIDGE, 1991; ARUFFO et al., 1992; TROWBRIDGE e THOMAS, 1994), hipótese essa, porém, não compartilhada por outros pesquisadores (CLARK, 1993; ENGEL et al., 1993).

2.3.2 MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CD45

Em estudo sobre a especificidade das globulinas policlonais antilinfocitárias, em que iniciaram a pesquisar a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD45 como indutores de um estado de anergia imune ante um aloenxerto, WARR e MARCHALONIS (1976) notaram a existência de reatividade a muitos antígenos na membrana linfocitária (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11a, CD25 e CD74), incidindo sobre o CD45 a reação mais intensa. Esses mesmos achados foram observados por outros autores (FABRE e WILLIAMS, 1977; FABRE et al., 1980; BONNEFOY-BERARD et al., 1991; REBELLATO et al., 1994).

FABRE et al. (1980), em modelo de aloenxertos em ratos, demonstraram que a globulina antilinfocítica específica para CD45 não foi tão efetiva quanto a globulina policlonal antilinfocítica no prolongamento da sobrevida dos enxertos, assim como não foi eficaz o anticorpo monoclonal anti-CD45 OX1, específico a todas as formas de CD45.

Estudos do anticorpo monoclonal anti-CD45 demonstram sua capacidade de inibir a resposta linfocitária a aloantígenos (HARP et al., 1983); a citotoxicidade específica a aloantígenos (LEFRANCOIS e BEVAN, 1985); a função de linfócitos *natural killers* (BROOKS e HOLSCHER, 1987); a ativação de linfócitos B (MITTLER et al., 1987;

LEDBETTER et al., 1988); a estimulação de linfócitos T por células dendríticas (PRICKET e HART, 1990) e a quimiotaxia de neutrófilos (HARVATH et al., 1991).

LAZAROVITS et al. (1992) foram os primeiros a demonstrar o potencial modulador do sistema imune do anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Em estudo *in vitro*, demonstraram que o anticorpo inibe a reação linfocitária a aloantígenos: analisando linfócitos T CD4, verificaram inibição na expressão de receptores para interleucina 2 e bloqueio da progressão do ciclo celular para a fase proliferativa quando as células foram submetidas a estímulo antigênico na presença do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MT3. Nesse experimento, os anticorpos monoclonais anti-CD45 GRT4 e OX1, específicos a todas as formas da molécula, foram inefetivos *in vitro*.

Foram também LAZAROVITS et al. (1996) pioneiros em demonstrar a eficácia do anticorpo monoclonal anti-CD45 para prolongar a sobrevida de aloenxertos; os autores utilizaram o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 no tratamento de aloenxertos renais em camundongos. Em alguns animais que apresentaram rejeição aguda foi possível a regressão do quadro; outro grupo tratado com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB (MB4B4) não apresentou diferenças em relação aos controles, manifestando rejeição precocemente.

2.4 IMUNOMODULAÇÃO NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS

2.4.1 MODULAÇÃO DO SINAL 1 E DO SINAL 2 NA ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA

BOWEN et al. (1980) tentaram modular a resposta imune através da diminuição da quantidade de APCs no enxerto. As ilhotas de Langerhans de camundongos BALB/c foram mantidas em meio de cultura com 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante 7-12 dias após o isolamento; após esse período foram transplantadas abaixo da cápsula renal de recipientes não-diabéticos (camundongos CBA/H). A análise histológica dos enxertos não demonstrou reação ao aloenxerto em um período de

seguimento de até 3 meses. As APCs são as responsáveis pelo início da resposta imune, pois expressam em sua membrana moléculas transcritas a partir do MHC do doador, reconhecidas pelos linfócitos T do receptor como estranhas ao organismo, de acordo com a teoria proposta pela primeira vez por SNELL (1957). A metodologia desse experimento se baseou no transplante de tecido tireóideo realizado por STONE et al. (1934), que submeteram o enxerto a um período de cultura antes do procedimento, obtendo excelentes resultados em termos de diminuição dos níveis de rejeição. Também se baseou no experimento de LAFFERTY e WOOLNOUGH (1977), no qual tecido tireóideo e paratireóideo foram mantidos em meio de cultura com 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante 3 a 4 semanas antes do transplante alogênico em camundongos; os animais não apresentaram rejeição durante um longo tempo de seguimento. A modulação do sistema imune obtida com essa metodologia pôde ser revertida através do transplante subsequente de tecido tireóideo da mesma espécie dos doadores não-mantido em meio de cultura: esse segundo transplante introduziu no receptor células apresentadoras de antígenos que iniciam a resposta imune. Os mesmos resultados em camundongos com a mesma metodologia foram observados por SIMEONOVIC et al. (1980), PROWSE et al. (1982), COULOMBE et al. (1994), COULOMBE e GILL, (1994a), COULOMBE e GILL, (1994b).

FAUSTMAN et al. (1981) diminuíram a antigenicidade de ilhotas de Langerhans de camundongos C57BL/6, transplantadas no território portal de camundongos B10.BR/SgSnJ diabéticos pela injeção de estreptozocina. Previamente ao procedimento, as ilhotas dos doadores foram tratadas com soro contendo complemento e anticorpos contra antígenos da classe Ia expressos em macrófagos e em células dendríticas que habitualmente estão presentes junto às ilhotas, causando destruição dessas células. Os cinco animais receptores apresentaram funcionamento do enxerto por mais de 200 dias, em contraste com o grupo controle sem tratamento, que apresentou rejeição entre 5 e 12 dias. Dois animais com mais de 200 dias pós-transplante foram submetidos a uma injeção de esplenócitos com APCs de camundongos da mesma raça dos doadores, rejeitando prontamente os enxertos.

KANAI et al. (1989) avaliaram o efeito de múltiplos transplantes de ilhotas de Langerhans no mesmo receptor, usando um pequeno número de cada vez. O princípio dessa metodologia é a introdução de pequena carga antigênica, não-suficiente para desencadear resposta imune no receptor, em múltiplos procedimentos, até se atingir o número de ilhotas suficiente para a reversão dos níveis hiperglicêmicos. Nessa pesquisa, camundongos B6AF diabéticos pela administração de estreptozocina receberam as ilhotas de camundongos C3H abaixo da cápsula renal. Nos animais submetidos a 4 transplantes de 50 ilhotas cada, com intervalo de 4 dias (8 animais) ou de 14 dias (7 animais), todos os enxertos permaneceram funcionantes durante mais de 200 dias. Os animais que receberam 4 transplantes com 50 ilhotas em um intervalo de 7 dias (8 animais) ou com 100 ilhotas em um intervalo de 4 dias (8 animais) ou de 14 dias (7 animais) apresentaram rejeição em média no 14º dia de pós-operatório; somente 1 enxerto em cada um desses dois últimos grupos apresentou funcionamento por mais de 200 dias.

COULOMBE et al. (1996) diminuíram a antigenicidade das ilhotas de Langerhans de camundongos C57BL/6ByJ por depleção do número de APCs tratando-as com ciclofosfamida durante o isolamento e posterior cultura a 37°C com 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante uma semana antes do transplante. Os receptores (10 camundongos BALB/c) diabéticos pela administração de estreptozocina receberam 400 ilhotas abaixo da cápsula renal. Esse grupo apresentou sobrevida do enxerto maior que 100 dias, em contraste com 10 animais do grupo controle, sem tratamento, que apresentaram rejeição no 15º dia de pós-operatório, em média. Esses achados demonstram que os sinais coestimulatórios fornecidos pelas APCs são necessários para provocar o início da reação de rejeição. Ainda nesse experimento, camundongos transgênicos RIP-B7-1+, expressando a molécula B7-1, ou camundongos transgênicos RIP-B7-1-, não expressando a molécula B7-1 nas ilhotas de Langerhans, foram usados como doadores. Os receptores foram sacrificados no 30º dia de pós-operatório e os rins com os enxertos foram avaliados por microscopia: nos grupos em que as ilhotas não haviam sido submetidas a cultura previamente ao transplante, tanto se usando camundongos RIP-B7-1+ (4 animais) quanto RIP-B7-1- (6 animais) como doadores, a avaliação histológica mostrou destruição

dos enxertos pela reação de rejeição. O grupo com doadores RIP-B7-1- (10 animais) submetidos a cultura prévia ao transplante não demonstrou evidência de infiltrado mononuclear; o grupo com doadores RIP-B7-1+ (10 animais) apresentou rejeição em 100% dos casos. Esses achados indicam que a presença do sinal coestimulatório através da molécula B7-1 é necessário para iniciar a reação de rejeição.

ASAKURA et al. (1997) analisaram o efeito do tratamento dos receptores de ilhotas de Langerhans com anticorpo monoclonal anti-CD4. As ilhotas, obtidas de camundongos A/J através do método de digestão pela ação da enzima collagenase, foram coletadas manualmente ou não e mantidas em meio de cultura durante 24 horas para diminuir a quantidade de APCs. Os receptores de isoenxertos (camundongos A/J) ou de aloenxertos (B6), diabéticos pela injeção de estreptozocina, receberam as ilhotas abaixo da cápsula renal: os aloenxertos sem tratamento foram rejeitados em 9 dias de pós-operatório em média; os isoenxertos apresentaram sobrevida indefinida. Nove animais foram tratados com o anticorpo anti-CD4 e transplantados com ilhotas coletadas manualmente, 7 apresentaram sobrevida maior que 100 dias. Esses animais foram submetidos a novo transplante, agora no outro pólo renal, utilizando-se ilhotas da mesma linhagem de doadores do enxerto anterior ou de uma terceira linhagem. Análise histológica dos rins realizada após 1 mês mostrou que todos os segundos enxertos apresentaram rejeição, enquanto os anteriores continuavam funcionando. A coleta manual das ilhotas ou a cultura durante 24 horas quando realizadas isoladamente produziram um discreto aumento da sobrevida dos enxertos. Nesse modelo muitas manobras foram realizadas para prolongar a sobrevida dos enxertos, todas com o objetivo de diminuir a quantidade de células dendríticas.

2.4.2 MODULAÇÃO DO SINAL 2

FRANGIPANE et al. (1977) realizaram um estudo em diversas linhagens de camundongos diabéticos pela administração de estreptozocina com posterior transplante de ilhotas de Langerhans; observaram em 14 animais que as ilhotas transplantadas de camundongos C57BL/6 machos para fêmeas foram rejeitadas em 3 a 7 dias. Nesse

mesmo experimento camundongos fêmeas foram imunizadas com tecido linfóide dos machos logo após o nascimento e submetidas quando adultas a um enxerto de pele com doadores machos, sem apresentar rejeição. Em 5 desses animais foi induzida diabetes com estreptozocina, seguida de transplante de ilhotas de Langerhans proveniente de camundongos machos. Os níveis hiperglicêmicos foram corrigidos em 24 horas e permaneceram normais até 200 dias de seguimento. A imunização logo após o nascimento, quando o sistema imune ainda não tinha maturado, tornou tolerantes as fêmeas, pois o antígeno Y (sinal 1) foi apresentado aos linfócitos T sem os sinais coestimulatórios (sinal 2), de maneira semelhante a apresentação dos antígenos próprios do organismo no timo, causando anergia ou apoptose e não uma resposta proliferativa.

CHAHINE et al. (1994) induziram sobrevida indefinida para ilhotas de camundongos C3H/HeJ transplantadas em camundongos C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina. Simultaneamente, foram transplantadas células musculares provenientes da mesma espécie de camundongos, modificadas por engenharia genética para produção da imunoglobulina CTLA4; além disso, os receptores receberam uma única dose de 1 mg do anticorpo monoclonal anti-LFA-1. Dos 12 animais tratados, 8 apresentaram sobrevida indefinida do enxerto. O uso de outro anticorpo monoclonal (controle) ou de células musculares também modificadas por engenharia genética para produção da imunoglobulina CTLA4, porém provenientes de outra linhagem de camundongos, não produziu aumento da sobrevida do enxertos. Nesse modelo, o sinal 2 (coestimulatório) foi bloqueado tanto pela imunoglobulina CTLA4, produzida pelas células musculares modificadas por engenharia genética, que se liga nas moléculas B7-1 e B7-2 nas APCs, quanto pelo anticorpo anti-LFA-1, que se liga na molécula LFA-1 nos linfócitos T

PARKER et al. (1995) estudaram o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD40L (250 µg, em aplicação intraperitoneal, duas vezes por semana durante 2 a 7 semanas, iniciada 8 dias antes do transplante), associado ou não a injeção endovenosa de linfócitos B provenientes de camundongos da mesma espécie dos doadores (88 milhões via endovenosa, 8 dias antes do transplante) em um modelo de camundongos

C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina. Ilhotas de Langerhans de camundongos BALB/c foram isoladas pelo método de digestão pela enzima collagenase e transplantadas abaixo da cápsula renal. Os animais que tinham recebido somente linfócitos ou não tinham recebido tratamento (grupo controle) apresentaram sobrevida dos enxertos de 15 ± 5 dias; os que tinham recebido somente o anticorpo anti-CD40L (25 animais), 24 ± 30 dias; entre os que tinham recebido a combinação de anticorpo com linfócitos (23 animais), 96% apresentaram sobrevida indefinida. O aumento da sobrevida dos enxertos é explicado pelo fato de que os linfócitos B injetados funcionam neste caso como apresentadores de antígenos (APCs) aos linfócitos T auxiliares. A interação de APC com o linfócito T ocorre primeiro pelo reconhecimento das moléculas transcritas a partir do MHC das APCs pelo TCR, o que resulta na expressão da molécula CD40L nos linfócitos T que interage na molécula CD40 na APC, causando sua ativação e conseqüente expressão das moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2, que por sua vez interagem com o complexo CTLA4/CD28 no linfócito T, também resultando em sua ativação. O uso do anticorpo anti-CD40L bloqueia esse processo, ocorrendo o mesmo com a injeção de linfócitos B considerados como APCs indutores de tolerância imunológica por apresentarem baixos níveis de expressão das moléculas B7-1 e B7-2.

STEURER et al. (1995) estudaram um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans em que as ilhotas dos doadores (camundongos DBA/2J) foram mantidas durante 1 hora, no pré-operatório, em um meio de cultura contendo a imunoglobulina CTLA4. Os enxertos foram posicionados abaixo da cápsula renal do rim esquerdo de camundongos B6AF1 diabéticos pela administração de estreptozocina; em 10 de 24 animais os enxertos permaneceram funcionantes até o 150º dia de pós-operatório, quando então os animais foram nefrectomizados, desenvolvendo novamente níveis glicêmicos elevados. Os animais foram mais uma vez submetidos a transplante de ilhotas da mesma espécie de doadores do transplante anterior no rim direito, e em 50% dos casos não apresentaram rejeição. Nesse experimento, os grupos controles, nos quais o transplante fora feito com ilhotas incubadas com uma IgG inespecífica ou somente com meio nutriente, apresentaram rejeição em 100% dos casos. A avaliação histológica dos

animais que desenvolveram tolerância apresentou um infiltrado persistente de células T CD4 e CD8 localizado ao redor das ilhotas, sem invadi-las.

LENSCHOW et al. (1995), num modelo de transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos C57BL/6 diabéticos pela ação de estreptozocina, estudaram o efeito da administração de anticorpos anti-B7-1, anti-B7-2, combinação dos dois anticorpos e imunoglobulina CTLA4, cada tratamento na dose de 50 µg via endovenosa em dias alternados, durante 14 dias. Quinhentas ilhotas provenientes de camundongos C3H/HeN foram transplantadas abaixo da cápsula do rim esquerdo. Os animais tratados com a imunoglobulina CTLA4 (7 animais) apresentaram sobrevida média do enxerto de 28,6 dias; os tratados com anticorpo anti-B7-2 (10 animais), 29,5 dias; os tratados com a combinação anti-B7-1 e B7-2 (8 animais), 43,4 dias. Esses resultados tiveram significativa diferença estatística em relação ao grupo tratado com anti-B7-1 (12,3 dias) e ao grupo controle (13,5 dias) tratado com uma IgG murina, o que demonstra a maior importância do bloqueio da molécula B7-2 em relação à B7-1 para a obtenção de prolongamento da sobrevida do enxerto. Surpreendentemente, a combinação de anticorpos anti-B7-1 e B7-2 causou um prolongamento da sobrevida dos enxertos superior ao obtido pela imunoglobulina CTLA4.

ROSSINI et al. (1996) induziram um aumento da sobrevida dos enxertos de ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos FVB posicionados abaixo da cápsula renal de camundongos C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina. Foram administrados aos receptores 250 µg do anticorpo monoclonal anti-CD40L, via intraperitoneal, duas vezes por semana, durante 7 semanas (iniciando-se 8 dias antes do transplante), em combinação ou não com a injeção endovenosa de 40 a 60 milhões de esplenócitos depletados de linfócitos T provenientes dos doadores (8 dias antes do transplante). Os enxertos no grupo controle (3 animais), sem tratamento, sobreviveram em média 11 dias. No grupo que recebeu somente o anticorpo anti-CD40L (5 animais), 20% atingiram 85 dias de pós-operatório sem rejeição, o que também ocorreu com 100% dos animais no grupo que recebeu a combinação do anticorpo com os esplenócitos (5 animais). Nesse experimento, o bloqueio do sinal coestimulatório nos linfócitos T com

o anticorpo anti-CD40L foi o responsável pelo aumento da sobrevida dos enxertos. Esse efeito foi exacerbado pelo grande número de APCs transplantados (esplenócitos depletados de linfócitos T), também impossibilitados de fornecer o sinal coestimulatório, fornecendo somente o sinal 1.

GAINER et al. (1997) realizaram transplantes de ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos CBA/H submetidos a transfecção de uma fração de DNA humano codificando a imunoglobulina CTLA4. Quinhentas ilhotas foram transplantadas abaixo da cápsula renal de camundongos BALB/c diabéticos pela administração de aloxan. Nos 10 animais submetidos à transfecção os enxertos funcionaram por $66,8 \pm 61,5$ dias; ao passo que duraram só $12,8 \pm 3,6$ dias nos 10 animais do grupo controle, nos quais foi realizada transfecção sem o gene da imunoglobulina CTLA4. A análise por imuno-histoquímica dos enxertos que sobreviveram mais de 50 dias demonstrou um infiltrado mononuclear adjacente às ilhotas, isto é, sem infiltrá-las.

TRAN et al. (1997) induziram tolerância a aloenxertos de ilhotas de Langerhans (provenientes de camundongos BALB/c) transplantadas abaixo da cápsula esplênica de camundongos B6AF1 diabéticos pela administração de estreptozocina. A imunoglobulina CTLA4 foi administrada aos animais via intraperitoneal (100 µg) em dias alternados, durante 14 dias (grupo 1), ou em dose única de 500 µg no 2º dia pós-transplante (grupo 2). No grupo 1 mais de 90% dos animais (13 em 14) permaneceram euglicêmicos durante mais de 100 dias após o transplante, ocorrendo o mesmo no grupo 2 (22 em 24 animais). Após 100 dias os animais foram nefrectomizados, advindo hiperglicemia. Foram-lhe então retransplantadas no rim remanescente ilhotas de camundongos BALB/c ou de uma terceira linhagem; os primeiros aceitaram o enxerto, mas os segundos desenvolveram rejeição. Submetidos ainda a enxerto de pele proveniente de camundongos BALB/c, esses animais tiveram sobrevida do enxerto mais longa (38 dias) do que o grupo controle composto por camundongos B6AF1 virgens de tratamento (13 dias). A molécula de CTLA4 foi produzida pela fusão de CTLA4 murino com uma cadeia pesada Fc, o que lhe confere a propriedade de ligar-se com as moléculas B7-1 e

B7-2 na superfície das APCs, bloqueando sua interação com a molécula CD28 na superfície dos linfócitos T (sinal 2).

ZHENG et al. (1997) estudaram o efeito do bloqueio dos sinais coestimulatórios das moléculas B7-1 e B7-2 expressas nas APCs com o uso da imunoglobulina CTLA4 em um modelo murino de transplante de ilhotas de Langerhans abaixo da cápsula renal. Nesse modelo, tanto os camundongos usados como doadores (BALB/c) quanto os usados como receptores (C57BL/6, diabéticos pela administração de estreptozocina) não expressavam a molécula B7-1, B7-2 ou ambas, devido à deleção do gene responsável pela sua produção. Nos transplantes em que os doadores e os receptores expressavam a molécula B7-1 (grupo controle, 10 animais), a sobrevida média dos enxertos foi de 10 dias, semelhante à sobrevida dos enxertos de doadores B7-1 negativos para receptores normais (15 animais, sobrevida média de 13 dias) e de doadores normais para receptores B7-1 negativos (15 animais, sobrevida média de 13 dias). No caso de doadores e receptores negativos para B7-1 (11 animais) houve aumento estatisticamente significativo da sobrevida média (16 dias); semelhante resultado foi observado para transplantes cardíacos realizados com a mesma linhagem de camundongos. Ainda com igual combinação de doadores e receptores, tratamento feito intraperitoneal no 2º dia de pós-operatório com 200 µg de imunoglobulina CTLA-4 (5 animais) ou do anticorpo anti-B7-2 (5 animais) causou sobrevida indefinida dos enxertos em 80 e 100% dos animais, respectivamente. Tais resultados demonstram que nesse modelo a molécula B7-1 não é essencial para o processo de rejeição; que as moléculas B7-1 e B7-2 dos APCs são os únicos ligantes para a molécula CD28 nos linfócitos T, e que o bloqueio desse sinal coestimulatório induz à sobrevida indefinida dos enxertos.

KOJA et al. (1997) estudaram o efeito da inoculação intratímica de células provenientes do timo de camundongos BALB/c em um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos C3H/He diabéticos pela injeção de estreptozocina. Quatrocentas ilhotas também provenientes de camundongos BALB/c foram transplantadas abaixo da cápsula renal do rim esquerdo. Sete dias antes do transplante,

1 milhão de células epiteliais provenientes de um tumor espontâneo do timo de camundongos BALB/c foram isoladas e inoculadas no timo dos receptores. Os animais do grupo controle, sem tratamento, e os animais tratados somente com a inoculação intratímica rejeitaram as ilhotas em uma média de 14 dias; os enxertos dos 5 animais tratados com a inoculação intratímica associada a uma injeção intraperitoneal de soro antilinfocítico 8, 5 e 3 dias antes do procedimento apresentaram sobrevida maior que 100 dias. Esses resultados sugerem que a presença de células do estroma do timo dos doadores no timo dos receptores proporciona as condições necessárias para a emergência de novos linfócitos T tolerantes. A administração de soro antilinfocítico é necessária para a supressão dos linfócitos T maduros capazes de iniciar a reação de rejeição.

ZHENG et al. (1999) estudaram o efeito de anticorpos anti-CD40L no transplante de ilhotas de Langerhans usando camundongos DBA/2 como doadores e camundongos B6AF1 diabéticos pela injeção de estreptozocina como receptores, nos quais foram transplantadas 300 a 400 ilhotas abaixo da cápsula renal do rim esquerdo. Os animais do grupo controle, sem tratamento, tiveram sobrevida média do enxerto de 15 dias; os animais tratados com o anticorpo anti-CD40L, 36 dias; os tratados 28 dias antes do transplante com anti-CD40L associado a imunização prévia com sangue de camundongos da mesma espécie do doador tiveram sobrevida indefinida do enxerto; os animais somente sensibilizados 28 dias antes do procedimento apresentaram aceleração do processo de rejeição. Sete dos animais com sobrevida indefinida do enxerto nefrectomizados no lado esquerdo no 150º dia de pós-operatório apresentaram hiperglicemia; desses 7 animais, 4 toleraram um segundo transplante com doadores da mesma espécie sem imunossupressão e 3 rejeitaram o segundo transplante de ilhotas provenientes de camundongos C3H. Ainda nesse mesmo grupo de 7 animais, 4 semanas após o transplante de ilhotas, 4 animais receberam enxerto cardíaco heterotópico proveniente de camundongos DBA/2 e não apresentaram rejeição. Esses resultados comprovam o desenvolvimento de tolerância não somente ao tecido endócrino pancreático, mas também a outros órgãos.

RASTELLINI et al. (1999a) avaliaram o efeito da combinação do anticorpo monoclonal anti-CD40L e da imunoglobulina CTLA4 no transplante de ilhotas provenientes de camundongos DBA/2, posicionadas abaixo da cápsula renal de camundongos C3H diabéticos pela administração de estreptozocina. Os animais que não haviam recebido tratamento ou haviam recebido somente o anticorpo anti-CD40L apresentaram rejeição em uma média de 19 dias de pós-operatório; 5 animais que haviam recebido a imunoglobulina CTLA4 apresentaram rejeição entre o 8º e o 26º dia de pós-operatório e 2 (29%) apresentaram sobrevida do enxerto de 54 e 56 dias. Os 9 animais submetidos à combinação das duas terapias apresentaram-se normoglicêmicos durante 81 a 180 dias de pós-operatório, quando então foram nefrectomizados, sobrevivendo aumento dos níveis glicêmicos. Esses animais, submetidos a enxerto de pele proveniente da mesma linhagem dos doadores de ilhotas, apresentaram tolerância; nos casos de tecido de linhagem diferente, apresentaram rejeição (RASTELLINI et al., 1999b)

2.4.3 MODULAÇÃO DO SINAL 1

SHIZURU et al. (1987) avaliaram o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD4 em um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos B57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina. Em cada animal foram transplantadas no fígado 600 a 800 ilhotas de camundongos A/J através de injeção na veia porta. Os 10 animais do grupo controle, sem tratamento, rejeitaram o enxerto no 13º dia de pós-operatório, em média. Os 10 animais tratados com o anticorpo anti-CD4 apresentaram sobrevida do enxerto superior a 90 dias. Os animais que apresentaram sobrevida superior a 120 dias (n=5) foram submetidos a administração intraperitoneal de 50 milhões de esplenócitos provenientes da mesma espécie dos doadores; 4 entre os 5 prontamente apresentaram rejeição, o que demonstra a importância da ação do anticorpo no momento que os antígenos são apresentados aos linfócitos T.

SHAPIRO e LIU (1995) estudaram o efeito da incubação de ilhotas de Langerhans isoladas de camundongos B10.BR com o anticorpo monoclonal anti-CD45. Quatrocentas ilhotas foram transplantadas abaixo da cápsula renal do rim esquerdo de

camundongos B10.D2 diabéticos pela administração de estreptozocina. No pré-operatório imediato, as ilhotas foram incubadas em solução salina de Hanks a 4°C, durante 50 minutos, contendo 10 µg do anticorpo monoclonal anti-CD45. Na avaliação pós-operatória a glicemia desses animais permaneceu normal durante $61,3 \pm 36,7$ dias, apresentando significativa diferença em relação ao grupo controle ($31,8 \pm 24,3$ dias). A ação do anticorpo não ocorre devido à depleção de células expressando a molécula CD45. A avaliação das ilhotas por citometria de fluxo mostrou diminuição não-significativa da expressão de CD45 (expressão em $4,9 \pm 0,3\%$ das células avaliadas) no caso de incubação com o anticorpo em relação à não-incubação (expressão em $5,6 \pm 3,8\%$ das células).

AUERSVALD et al. (1997) verificaram o efeito do anticorpo monoclonal anti-CD45RB em camundongos C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina submetidos a enxerto de ilhotas de Langerhans de camundongos BALB/c posicionado abaixo da cápsula renal. Entre os diversos regimes de administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 usados, verificou-se que quando adotado o de uma dose de 100 µg via endovenosa aplicada 1 dia antes da cirurgia, no pré-operatório imediato e no 5º dia de pós-operatório, 3 em 5 animais apresentaram-se euglicêmicos por um período maior que 100 dias; os animais do grupo controle sem tratamento rejeitaram o enxerto no 11º dia de pós-operatório em média. Quando se utilizou o anticorpo monoclonal anti-CD45RB C363.16A proveniente de outro hibridoma, no mesmo regime de administração, os camundongos também apresentaram significativo prolongamento da sobrevida do enxerto (25 dias) em relação ao grupo controle.

BASADONNA et al. (1998) demonstraram a capacidade do anticorpo monoclonal anti-CD45RB de induzir tolerância imunológica em camundongos C57BL/6 diabéticos pela administração de estreptozocina submetidos a enxerto de ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos BALB/c posicionado abaixo da cápsula renal. Os receptores foram tratados com 100 µg via endovenosa do anticorpo MB23G2 1 dia antes da cirurgia, no pré-operatório imediato e no 5º dia de pós-operatório. Dos 14 animais tratados, 7 permaneceram euglicêmicos até o 120º dia de pós-operatório,

quando então foram nefrectomizados, do que resultou o retorno da glicemia para os mesmos níveis do pré-operatório. Desses 7 animais, 4 foram submetidos a novo transplante de ilhotas no rim contralateral, usando-se novamente como doadores camundongos BALB/c; 3 deles permaneceram euglicêmicos até o 50º dia de pós-operatório; os outros 3 animais foram submetidos a transplante de ilhotas proveniente de outra espécie de camundongos, apresentando rejeição no 10º dia de pós-operatório.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

3.1.1 CULTURA DO HIBRIDOMA

Foi utilizado hibridoma HB 220 (American-Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA), produtor do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2, estocado em nitrogênio líquido a 185°C negativos. As células foram descongeladas e colocadas em frascos de cultura celular de 75 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) contendo 10 ml de solução nutriente para cultura de células leucêmicas humanas RPMI com 2% de L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA), 10% de soro fetal bovino (Gemini Bioproducts, Calabasas, Califórnia, EUA) e 0,1% de gentamicina (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA). Após 3 dias de cultura em incubadora de CO₂ Napco (Chicago, Illinois, EUA) modelo 6200 a 36,5°C, foram transferidos 9,5 ml da solução para um frasco de cultura celular de 250 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New York, EUA) contendo 41 ml de média nutriente; o 0,5 ml restante foi colocado em outro frasco de 75 ml contendo 9,5 ml de média nutriente e estocado na incubadora para utilização futura. Após mais 3 dias de cultura, 150 ml de média nutriente foram adicionados ao frasco de 250 ml e a solução dividida em 2 frascos de cultura celular de 750 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) contendo cada um 100 ml. Após 3 dias de cultura foram adicionados em cada frasco 75 ml de média nutriente e 225 ml de média nutriente sem soro fetal bovino. O conteúdo de cada frasco foi então dividido em 5 frascos de cultura celular de 750 ml contendo cada um 160 ml. Após 5 dias de cultura em incubadora iniciou-se a avaliação da viabilidade das células do hibridoma.

3.1.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular foi realizada a cada 3 dias, até a constatação de inviabilidade em 90% das células do hibridoma, situação na qual se obteve a maior quantidade de anticorpos. Foram colhidos 50 µl do meio de cultura do hibridoma e realizada coloração das células com 50 µl de *trypan blue* (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA). A contagem das células foi realizada com um hemocitômetro (Hausser Scientific, Chicago, Illinois, EUA) em microscópio óptico Nikon (Melville, New York, EUA) modelo TMS-F, com aumento de 100x. As células viáveis apresentavam intenso brilho, em contraste com as células mortas, que se apresentavam opacas. Após constatação de morte celular de 90% das células, os 800 ml de solução contidos nos 5 frascos de cultura foram transferidos para um frasco de vidro de 1.000 ml, o qual foi estocado em câmara fria a 4 °C negativos.

3.1.3 PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

A purificação do anticorpo foi realizada com uma coluna de proteína G (Sigma Chemical, Saint Louis, Missouri, EUA) dentro de uma câmara fria a 4°C negativos. A coluna foi perfundida com a solução da cultura celular a uma velocidade de 1 ml/min por gradiente de gravidade. O anticorpo monoclonal anti-CD45RB ficou aderido na coluna, sendo desprezado o restante da solução. Realizou-se a coleta do anticorpo perfundindo a coluna com solução de glicina 0,15 molar com pH 2,7 (American Bioanalytical, Natick, Massachusetts, EUA) com bomba infusora (Bio Rad, Hercules, Califórnia, EUA) a uma velocidade de 6,4 ml/minuto. Para a coleta do anticorpo diluído na solução de glicina foram preparados 17 tubos de ensaio de vidro de 4,5 ml (VWR Scientific, Boston, Massachusetts, EUA) contendo 0,25 ml de solução TRIS (hidroximetilaminometano) 1 molar com pH 9 (American Bioanalytical, Natick, Massachusetts, EUA). À medida que a solução de glicina passa pela coluna, ela libera os anticorpos com seu pH ácido, tornando-os, porém, instáveis, o que é evitado coletando-os em solução com pH básico. Os 2 primeiros tubos foram usados somente como controle do pH, adicionando-se à

solução de TRIS 2 ml de solução de glicina 0,15 molar com pH 2,7. O pH foi então medido com fitas reagentes (EM Science, Gibbatown, New Jersey, EUA) com o objetivo de deixá-lo entre 8 e 8,5, podendo-se adicionar algumas gotas a mais de glicina como ajuste. O nível do volume de solução contido nos dois tubos controle foi marcado nos outros 15 tubos e o anticorpo foi coletado tubo após tubo até a marca.

3.1.4 CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

Uma medição inicial da concentração de anticorpos foi realizada com espectrofotômetro (Pharmacia, Londres, Inglaterra) modelo Retrospect III, com comprimento de onda de 280 nm. Os 2 tubos de ensaio usados como controle para a determinação do pH foram utilizados como referência (ausência de anticorpos, zero na leitura do espectrofotômetro). Em seguida os 15 tubos contendo os anticorpos foram avaliados, e utilizados somente os que continham quantidade significativa de proteína. A quantidade de anticorpos em miligramas foi determinada através da média dos valores obtidos no espectrofotômetro para os tubos com quantidade significativa de proteína, multiplicada por 0,75 (usando a avaliação do espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm, o valor para a concentração de 1,0 mg/ml corresponde na realidade a 0,75 mg/ml).

O conteúdo dos tubos selecionados foi dialisado durante 3 horas em 1.000 ml de PBS 1% com uma membrana semipermeável Snake Skin® (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, EUA) dentro da câmara fria a 4°C. A diálise foi repetida novamente durante 3 (em 1.000 ml de PBS 1%) e 12 horas (em 2.000 ml de PBS 1%).

Após a diálise, a solução foi colocada em um sistema de ultrafiltração (Amicon, Beverly, Massachusetts) e centrifugada a 3.000 rotações por minuto durante 30 minutos em centrífuga Beckman modelo GS-6R (Palo Alto, Califórnia, EUA), com o objetivo de reduzi-la à concentração de 1 mg/ml, com base nos valores do volume e quantidade de anticorpos obtidos previamente na medição com o espectrofotômetro. Os resultados dessa metodologia são aproximados, necessitando nova avaliação da concentração.

3.1.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

A avaliação da concentração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB foi realizada com o kit “Bio Rad DC Protein®”. Usaram-se como parâmetros os valores de uma imunoglobulina (IgG) de coelho (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA) a 2 mg/ml, diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 1% (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA), em diferentes concentrações distribuídas em 5 tubos de ensaio de 4,5 ml (tabela 1).

TABELA 1 - TITULAÇÃO DA IgG PADRÃO COM PBS 1%

	Tubo 1 (0)	Tubo 2 (25%)	Tubo 3 (50%)	Tubo 4 (75%)	Tubo 5 (100%)
IgG	0	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl
PBS 1%	100 µl	75 µl	50 µl	25 µl	0

IgG - imunoglobulina de coelho tipo G; PBS 1% - solução salina tamponada com fosfato a 1%.

O anticorpo monoclonal anti-CD45RB foi diluído em 3 tubos de ensaio de 4,5 ml, de maneira semelhante, com base em sua concentração aproximada de 1 mg/ml após ultrafiltração (tabela 2).

TABELA 2 – TITULAÇÃO DE ANTI-CD45RB COM PBS 1%

	Tubo 1 (25 %)	Tubo 2 (50 %)	Tubo 3 (100 %)
Anti-CD45RB	25 µl	50 µl	100 µl
PBS 1%	75 µl	50 µl	0

PBS 1% - solução salina tamponada com fosfato a 1%;
Anti-CD45RB - anticorpo monoclonal anti-CD45.

Em todos os tubos, tanto nos que continham IgG padrão quanto nos que continham anticorpo monoclonal anti-CD45RB, foi adicionado 0,5 ml de Reagente A (Biorad Laboratories, Hércules, Califórnia, EUA) e 4 ml de Reagente B (Biorad Laboratories, Hércules, Califórnia, EUA), sendo todos incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Os tubos contendo a IgG padrão e o anticorpo monoclonal anti-CD45RB foram avaliados no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 750 nm tendo como referência 0 (zero) o tubo 1 (grupo IgG) contendo somente PBS 1%.

Construiu-se um gráfico com o programa “Cricket Graph®”, relacionando os dados obtidos na espectrofotometria para a IgG padrão com os valores reais de anticorpo, no qual 0,75 nm na espectrofotometria corresponde a uma concentração de 2 mg/ml.

Os valores na leitura do espectrofotômetro para o anticorpo monoclonal anti-CD45RB foram avaliados nesse gráfico estabelecendo sua concentração nas 3 diferentes diluições. Os valores foram multiplicados por um fator de conversão para a concentração de 100% (tabela 3), sendo a concentração final do anticorpo (mg/ml) a média dos valores obtidos para os 3 tubos.

TABELA 3 - FATOR DE CONVERSÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES DO ANTICORPO ANTI-CD45RB

	Concentração	Fator conversão
Tubo 1	25%	4
Tubo 2	50%	2
Tubo 3	100%	1

De acordo com a concentração obtida, o anticorpo foi diluído em PBS 1% até uma concentração de 1 mg/ml e estocado em refrigerador na temperatura de 4 °C.

3.1.6 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

A avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal anti-CD45RB para linfócitos T foi realizada através de imunofluorescência indireta, sendo as células avaliadas por citometria de fluxo.

3.1.6.1 Imunofluorescência indireta

Inicialmente realizou-se esplenectomia em um camundongo C57BL/6. O animal foi posicionado em decúbito dorsal sob anestesia inalatória com pentobarbital sódico (Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois, EUA). A cavidade abdominal foi aberta através de incisão mediana, o pedículo esplênico exposto e seccionado, retirando-se o órgão. O baço foi colocado em uma placa de Petri de 100 x 15 mm contendo PBS 1% e massageado gentilmente com duas lâminas de vidro para retirada dos esplenócitos do interior da cápsula do órgão. A solução de PBS 1% contendo os esplenócitos foi aspirada, evitando-se os pequenos fragmentos da cápsula; colocada em um tubo de polietileno cônico de 15 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) e centrifugada a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, foi realizada lise hipotônica das hemácias do precipitado adicionando-se 900 µl de água destilada. A reação foi interrompida após 5 segundos com a adição de 100 µl de PBS 10% (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA) e 4 ml de PBS 1%. Após decantação durante 1 minuto na temperatura ambiente, a solução foi aspirada evitando-se o precipitado (hemácias após a lise), colocada em um tubo de ensaio de vidro de 4,5 ml e centrifugada a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 5 ml de PBS 1% foram adicionados. Os esplenócitos foram contados com o hemocitômetro no microscópio óptico com aumento de 100x, determinando-se o número de células por mililitro.

Colocaram-se 500.000 esplenócitos diluídos na solução de PBS 1% em 7 tubos de ensaio de vidro de 4,5 ml (tubos T1 até T7), centrifugados a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, deixando-se somente o precipitado contendo os esplenócitos.

Em outros 6 tubos de ensaio de vidro de 4,5 ml (tubos A1 até A6) foram realizadas diluições seriadas do anticorpo monoclonal anti-CD45RB (1 mg/ml) em soro de coelho (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) a 5% em PBS 1%, conforme a tabela 4.

TABELA 4 - DILUIÇÃO SERIADA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB EM SORO DE COELHO

Tubo	A1	A2	A3	A4	A5	A6
C	50 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml

C - concentração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB em soro de coelho.

Cem microlitros de cada tubo (A1 até A6) com diferentes concentrações de anticorpo monoclonal anti-CD45RB (anticorpo primário) em soro de coelho foram incubados nos tubos contendo os esplenócitos, conforme a tabela 5. O tubo T1 contendo somente esplenócitos foi usado como controle.

TABELA 5 – INCUBAÇÃO DE ESLENÓCITOS E ANTICORPO ANTI-CD45RB

Esplenócitos	Tubo T1	Tubo T2	Tubo T3	Tubo T4	Tubo T5	Tubo T6	Tubo T7
Anti-CD45RB	0	100 µl do tubo A1	100 µl do tubo A2	100 µl do tubo A3	100 µl do tubo A4	100 µl do tubo A5	100 µl do tubo A6

Anti-CD45RB – anticorpo monoclonal anti-CD45RB.

Depois de incubados durante 30 minutos em gelo picado, os tubos T1 até T7 receberam 4,0 ml de PBS 1% com 2% de soro fetal bovino cada um e foram centrifugados a 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e mais 4,0 ml de PBS 1% com 2% de soro fetal bovino foram adicionados a cada tubo seguido de nova centrifugação e aspiração do sobrenadante. A seguir foram adicionados a cada tubo 2 µl do anticorpo secundário (anticorpo de cabra anti-rato, do tipo IgG, conjugados com fluoresceína-isotiocianato a 0,5 mg/ml, da Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA), diluídos em um volume de 100 µl de soro de coelho 5%. Os tubos T1 até T7 foram novamente incubados durante 30 minutos em gelo picado e novo ciclo de centrifugação com PBS 1% com 2% de soro fetal bovino foi realizado. O sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado fixado com 4 µl de formaldeído 1% (Baker, Phillipsburg, New Jersey, EUA) em PBS1%.

3.1.6.2 Citometria de fluxo

Os tubos contendo os esplenócitos conjugados com os anticorpos em diferentes diluições foram avaliados por um citômetro de fluxo (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) modelo Facscalibur. Os dados obtidos pela citometria foram analisados pelo programa “Cell Quest®” (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA). Inicialmente avaliou-se a população geral de células presentes nos tubos. Os linfócitos foram selecionados de acordo com o tamanho de seu núcleo e a quantidade de citoplasma (núcleo grande com pouca quantidade de citoplasma). A seguir avaliou-se a fluorescência do anticorpo monoclonal anti-CD45RB conjugado com anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC, ligados na membrana dos linfócitos.

3.2 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CTLA4

O anticorpo monoclonal anti-CTLA4 foi obtido do Laboratório de Transplante de Órgãos e Imunogenética do Brigham and Women's Hospital da Universidade de Harvard em Boston. O anticorpo na concentração inicial de 3 mg/ml foi diluído em PBS 1% a 2 mg/ml.

3.3 DIVISÃO DOS ANIMAIS

Animais submetidos e não-submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans foram avaliados. Os animais submetidos ao transplante foram utilizados para avaliação da sobrevida dos enxertos e análise por citometria de fluxo; os animais não-submetidos a enxerto foram utilizados somente para análise por citometria de fluxo.

As injeções endovenosas foram administradas no seio orbital do olho direito dos camundongos. No pós-operatório foram mantidos dois animais por gaiola no Centro de Animais da Universidade de Yale, com livre acesso a ração e água, em sala mantida em temperatura entre 18 e 22°C.

3.3.1 ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE

Nos casos de aloenxertos, os doadores de ilhotas pancreáticas foram camundongos BALB/c (H-2^d) machos; os receptores foram C57BL/6 (H-2^b) machos (Charles River, Boston, Massachusetts, EUA). Nos casos de isoenxertos usaram-se camundongos BALB/c (H-2^d) machos como doadores e receptores. Os animais foram divididos em 5 grupos e tratados conforme mostra a tabela 6.

TABELA 6 – GRUPOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE

Grupo	Enxerto	n	Regime terapêutico
I	isoenxerto	10	100 µl ev PBS1% dias -1,0 e +5
II	aloenxerto	8	100 µl ev PBS1% dias -1,0 e +5
III	aloenxerto	17	100 µg ev anti-CD45RB dias -1,0,+5
IV	aloenxerto	8	200 µg ip anti-CTLA4 dias -1,0 e +1
V	aloenxerto	13	100 µg ev anti-CD45RB dias -1,0,+5 e 200 µg ip anti-CTLA4 dias -1,0 e +1

ev – via endovenosa; ip – via intraperitoneal; -1, 0 e +5 - 1 dia antes do procedimento, no dia do procedimento e no quinto dia de pós-operatório; -1, 0 e +1 - 1 dia antes do procedimento, no dia do procedimento e no primeiro dia de pós-operatório;

PBS1% - solução salina tamponada com fosfato a 1%; n – número de animais.

3.3.2 ANIMAIS NÃO-SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE

Camundongos C57BL-6 machos não-submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans foram divididos em 2 grupos, conforme mostra a tabela 7. As injeções endovenosas do anticorpo monoclonal anti-CD45RB foram administradas nos mesmos intervalos de tempo adotados para os animais submetidos ao transplante.

TABELA 7 – GRUPOS DE ANIMAIS NÃO-SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE

Grupo	n	Regime terapêutico
I	5	100 µl ev PBS1% dias 0,1 e 6
II	5	100 µg ev anti-CD45RB dias 0, 1, 6

ev – via endovenosa; PBS1% - solução salina tamponada com fosfato a 1%; n – número de animais.

3.4 INDUÇÃO DE DIABETE QUÍMICA

Previamente a cada transplante, foi induzida diabetes química através de injeção intraperitoneal de estreptozocina (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) em uma dose de 200 mg/Kg diluída em 0,1 ml de solução salina isotônica. Após 7 dias, a glicemia sanguínea foi verificada com um glucômetro portátil (Bayer Corporation, Elkhart, Indiana, EUA), realizando-se a coleta das amostras sanguíneas por secção da porção distal da cauda dos animais. Foram selecionados como receptores somente os animais com glicemia superior a 400 mg/dl, confirmada novamente no dia do transplante. Para os animais não transplantados até 7 dias após a constatação inicial dos níveis hiperglicêmicos foi iniciada insulina Lente® (Eli Lilly and Company, Indianápolis, Indiana, EUA) 1:1000 em solução salina isotônica 0,2 ml via subcutânea em dias alternados.

3.5 TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS

3.5.1 PANCREATECTOMIA NOS DOADORES

As pancreatectomias foram realizadas com auxílio de microscópio de dissecação (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, New York, EUA) modelo AO569, com aumento de 10 vezes. Os animais foram anestesiados via inalatória com pentobarbital sódico (Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois, EUA), posicionados em decúbito dorsal; realizando-se anti-sepsia com etanol a 70%, incisão abdominal mediana com ressecção do apêndice xifóide, exposição da cavidade abdominal e identificação do ducto biliar; este foi clampeado com clamp vascular na sua inserção no duodeno, dissecado logo após a união dos ductos hepáticos direito e esquerdo e canulado com agulha de 27,5 *gauge* (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA). Quanto ao pâncreas, foi distendido com 3 ml de solução de collagenase (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, Missouri, EUA) a 1,5 µg/ml, em solução salina balanceada de Hanks (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA), por fluxo retrógrado pelo ducto pancreático (figura 1A). A aorta torácica foi seccionada com tesoura de íris introduzida através do diafragma para

evitar hemorragia no tecido pancreático, o qual foi excisado, colocado em uma placa de Petri de 60x15 mm (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA), conforme mostra a figura 1B, e seccionado em pequenos fragmentos com a mesma tesoura. Foram utilizados cinco doadores por receptor. Após a pancreatectomia, os pâncreas foram distribuídos em 2 frascos de cultura de células de 75 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) colocados em gelo picado; o primeiro contendo 3 e o segundo 2 órgãos.

3.5.2 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

Os 2 frascos de cultura de células foram colocados em incubadora (Fisher Scientifics, Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) a 37°C durante 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 40 ml de solução salina balanceada de Hanks gelada com 10% de soro de bezerro (Gibco BRL, Grand Island, New York, EUA). A solução foi transferida para 2 tubos cônicos de 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA), submetida a agitação manual vigorosa durante 10 segundos e a 3 ciclos de centrifugação a 1.400 rotações por minuto durante 5 minutos. Intercalados com os 3 ciclos de centrifugação, foram realizados 3 ciclos de lavagem das ilhotas: desprezo do sobrenadante permanecendo no frasco somente o precipitado contendo as ilhotas; adição de 30 ml de solução salina de Hanks com 10% de soro de bezerro; agitação manual da solução até dissolução completa do precipitado. Entre o segundo e o terceiro ciclo de centrifugação e lavagem, a solução foi passada por um filtro metálico com poros de 850 µm de diâmetro (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) modelo P40.

Após o último ciclo de centrifugação e lavagem, foram adicionados ao precipitado de cada frasco 10 ml de solução de Ficoll® (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) e realizados sucessivos ciclos de aspiração da solução com uma pipeta de 10 ml, evitando-se a formação de bolhas, com a finalidade de diluir na solução de Ficoll® as ilhotas contidas no precipitado. Com uma pipeta acrescentaram-se lentamente em cada frasco 10 ml de solução salina de Hanks, formando uma interface com a solução de Ficoll® contendo as ilhotas de Langerhans. Os 2 frascos foram centrifugados (sem

freios) a 2.400 rotações por minuto durante 20 minutos, obtendo-se ao final duas interfaces: a primeira entre o precipitado (contendo tecido adiposo e vasos linfáticos) e a solução de Ficoll®, e a segunda entre a solução de Ficoll® e a solução salina de Hanks. Devido ao gradiente de densidade das ilhotas de Langerhans, elas foram posicionadas na interface da solução de Ficoll® com a solução salina de Hanks. As ilhotas de Langerhans e a solução de Ficoll® dos 2 frascos foram aspiradas com uma pipeta de 10 ml e colocadas em um único frasco cônico de 50 ml, completando-se seu volume com solução salina de Hanks com 10% de soro de bezerro. Mais 3 ciclos de centrifugação e lavagem foram realizados, conforme já citado, sem filtração da solução entre o segundo e o terceiro ciclo. O precipitado final foi diluído em 20 ml de solução salina de Hanks e 10% de soro de bezerro através de agitação manual do frasco.

3.5.3 CONTAGEM DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

Colocada a solução final em uma placa de Petri de 100x15 mm (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA), as ilhotas de Langerhans foram contadas com auxílio do microscópio de dissecação. Contaram-se somente as ilhotas de Langerhans sem rotura da membrana e com diâmetro aproximado entre 150 e 400 μm . À medida que eram contadas, as ilhotas eram aspiradas com uma pipeta de Pasteur (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) e colocadas em uma placa de Petri de 60 x 15 mm contendo solução salina balanceada de Hanks com 10% de soro de bezerro (figura 1C). Para cada transplante foram separadas 400 ilhotas de Langerhans.

3.5.4 TRANSPLANTE NO RECEPTOR

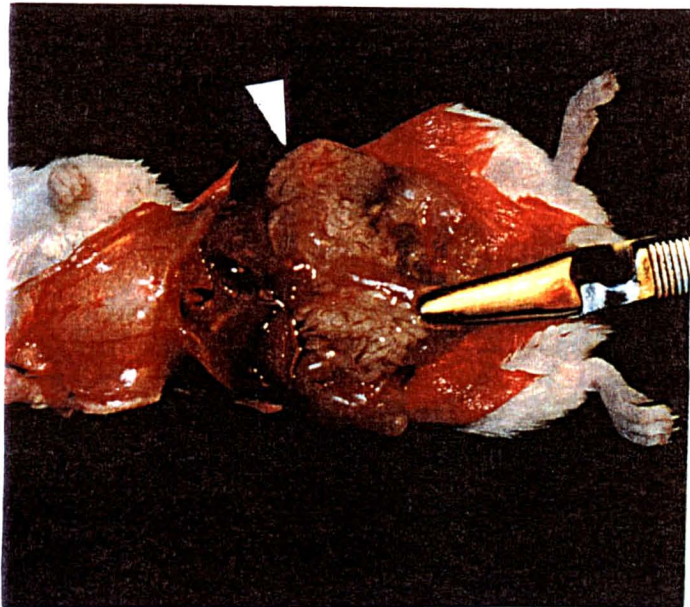
As ilhotas de Langerhans suspensas na solução salina balanceada de Hanks com 10% de soro de bezerro foram aspiradas com uma seringa de Hamilton® (Hamilton Corporation, Reno, Nevada, EUA) previamente preparada com 0,6 ml de solução salina de Hanks, tendo acoplada em sua extremidade uma ponta de pipeta de microaspiração (Oxford, Sanford, Maine, EUA). A seringa foi mantida na posição vertical até que as ilhotas se posicionassem por ação da gravidade na extremidade da pipeta de

microaspiração, em cuja ponta foi acoplado um tubo de polietileno Intramedic® (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) medindo 0,965 mm de diâmetro e 20 cm de comprimento, previamente infundido com etanol a 70%, água destilada, silicone Sigmacote® (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), água destilada novamente e solução salina balanceada de Hanks, essa última permanecendo no seu interior. As ilhotas foram injetadas no interior do tubo até a metade do seu comprimento; nesse ponto, o tubo foi dobrado sobre si mesmo, ocluído com um pequeno pedaço de outro tubo de polietileno com diâmetro de 1,27 mm, desacoplado da seringa e centrifugado a 900 rotações por minuto durante 2 minutos, com a extremidade ocluída voltada para baixo com a finalidade de comprimir as ilhotas de Langerhans e facilitar a injeção. Conectado novamente à seringa e desocluída sua porção média, foi seccionado distalmente às ilhotas de Langerhans comprimidas.

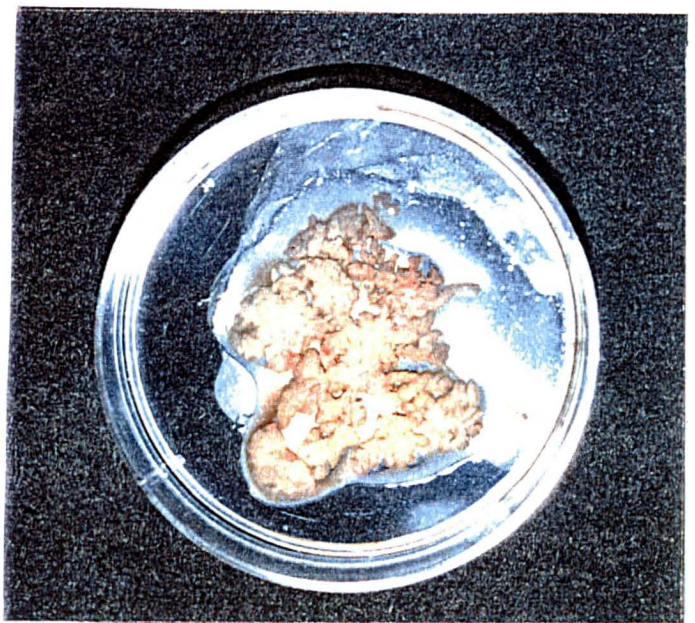
Anestesiado o camundongo C57BL/6 (H-2^b) com pentobarbital sódico, realizou-se tricotomia na região lombar esquerda e anti-sepsia com etanol a 70%, seguida de lombotomia esquerda com exposição do rim. Durante todo o procedimento, o rim foi constantemente irrigado com solução salina balanceada de Hanks utilizando-se uma seringa de 10 ml (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) com agulha de 25 *gauge* (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, EUA) para evitar o ressecamento de sua cápsula. Passou-se ao redor do pedículo vascular renal um tubo de polietileno para conferir estabilidade ao órgão durante o procedimento. Através de um pequeno orifício feito na cápsula renal com a agulha de 25 *gauge*, a ponta de uma pipeta de Pasteur foi introduzida entre o parênquima renal e a cápsula, confeccionando-se gentilmente uma loja com volume suficiente para acomodar as ilhotas de Langerhans. A ponta do tubo de polietileno (conectado à seringa de Hamilton®) foi introduzida pelo orifício da cápsula na loja subcapsular e nela lentamente injetadas as ilhotas de Langerhans (figura 1D). O tubo foi retirado, o orifício cauterizado com cautério oftálmico (Solan, Chicago, Illinois, EUA), o rim introduzido novamente na cavidade abdominal e a parede e a pele suturados com pontos separados de seda 3-0 (Ethicon, Sommerville, New Jersey, EUA).

FIGURA 1 - TRANSPLANTE DE ILHOTAS DE LANGERHANS

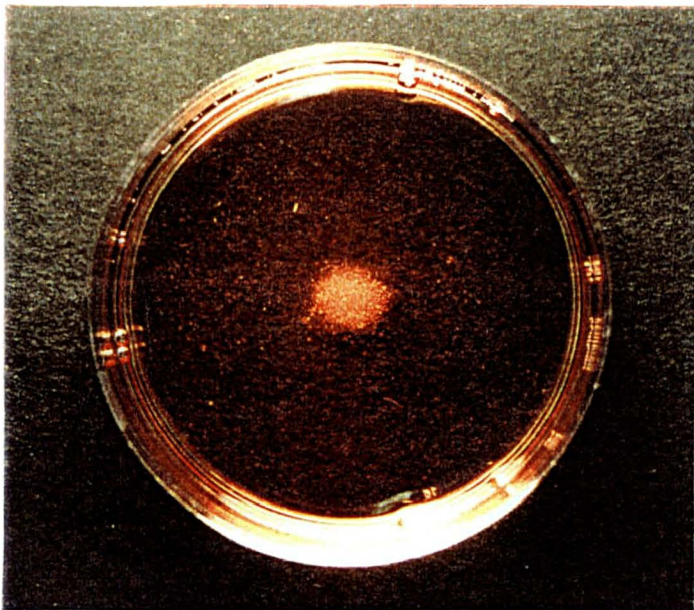
A



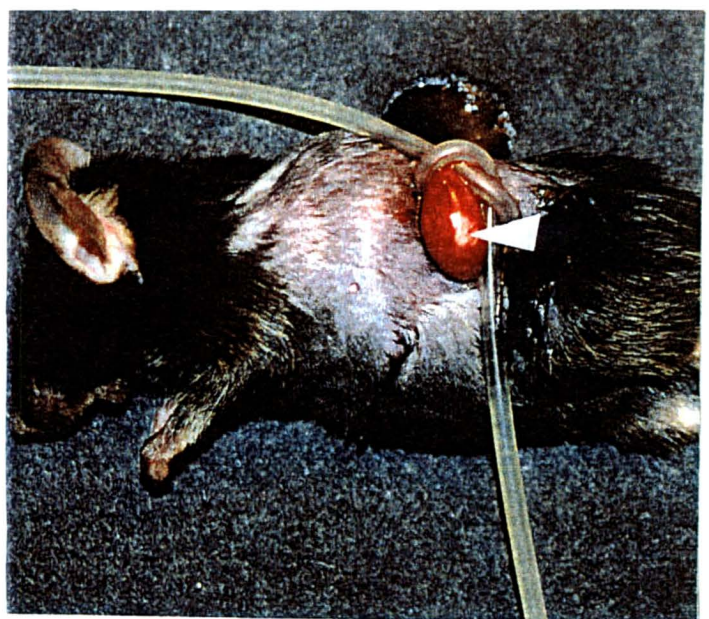
B



C



D



A – Distensão pancreática (seta) com solução de collagenase por fluxo retrógrado em um camundongo BALB/c. B – Espécime após pancreatectomia. C – Ilhotas de Langerhans após contagem manual. D – Ilhotas de Langerhans transplantadas abaixo da cápsula renal do rim esquerdo de um camundongo C57BL/6 (seta).

3.6 AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

3.6.1 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO

A glicemia dos animais foi verificada com glucômetro no 3º, 5º, 7º e 10º dia de pós-operatório e depois a cada 5 dias até apresentarem rejeição ou até o 120º dia. Os 3 últimos animais dos grupos II, III, IV e V foram avaliados no 3º, 5º, 7º dia de pós-operatório e sacrificados. Glicemia acima de 200 mg/dl no 3º dia de pós operatório foi considerada não-funcionamento primário do enxerto; glicemia acima de 200 mg/dl em qualquer outro dia foi considerada rejeição ao enxerto. Após 24 horas a glicemia foi novamente avaliada, para confirmação do diagnóstico de não-funcionamento primário ou de rejeição.

3.6.2 SEGUIMENTO DOS ANIMAIS

3.6.2.1 Animais avaliados por citometria de fluxo

Os 3 últimos animais dos grupos II, III, IV e V (submetidos ao transplante), depois de sujeitos a nefrectomia esquerda e a esplenectomia, foram sacrificados no 7º dia de pós-operatório. Posicionados os animais em decúbito dorsal sob anestesia inalatória com pentobarbital sódico, realizou-se uma incisão abdominal mediana com exposição da cavidade abdominal. O rim esquerdo contendo o enxerto foi isolado; o pedículo vascular, ligado com fio de algodão 3-0 e seccionado e o órgão retirado. O pedículo vascular do baço foi dissecado, ligado com algodão 3-0 e o órgão retirado. Os animais foram sacrificados por secção da aorta torácica através do diafragma. Os rins foram avaliados histologicamente e os baços utilizados para avaliação de linfócitos T CD4 por citometria de fluxo. Todos os animais dos 2 grupos não-submetidos ao transplante foram esplenectomizados e sacrificados no 8º dia após a 1ª injeção endovenosa; os baços foram usados para avaliação de linfócitos T CD4 por citometria de fluxo.

3.6.2.2 Isoenxertos

No 120º pós-operatório, os animais com isoenxerto foram submetidos a nefrectomia esquerda para análise histológica e sacrificados.

A glicemia sanguínea foi verificada no 5º dia após a nefrectomia, para comprovação do funcionamento prévio do enxerto.

3.6.2.3 Aloenxertos sem tratamento

Os aloenxertos sem tratamento foram submetidos a nefrectomia esquerda para análise histológica, conforme já descrito, à medida que apresentavam rejeição.

3.6.2.4 Aloenxertos tratados com anti-CD45RB

Os animais que apresentaram rejeição antes do 120º dia de pós-operatório foram submetidos a nefrectomia esquerda para análise histológica e sacrificados. Os animais com o enxerto funcionando foram submetidos no 120º dia de pós-operatório a nefrectomia esquerda e os rins avaliados por histologia. A glicemia foi medida no 5º dia de pós-operatório e os animais com níveis glicêmicos acima de 200 mg/dl foram submetidos a novo transplante (lado direito), utilizando-se ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos BALB/c (H-2^d) e também de camundongos CBA/H (H-2^K). A glicemia após o segundo transplante foi medida conforme descrito para o primeiro. Tanto os animais que alcançaram o 50º dia de pós-operatório quanto os que apresentaram rejeição foram submetidos a nefrectomia direita para análise histológica e sacrificados.

3.6.2.5 Aloenxertos tratados com anti-CTLA4

Os animais receptores de aloenxertos tratados com anti-CTLA4 foram submetidos a nefrectomia esquerda para análise histológica, conforme já descrito, à medida que apresentavam rejeição.

3.6.2.6 Aloenxertos tratados com anti-CD45RB e anti-CTLA4

Os animais receptores de aloenxertos tratados com a combinação de anticorpos foram submetidos a nefrectomia esquerda para análise histológica, conforme já descrito, à medida que apresentavam rejeição.

3.7 AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4 POR IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA E CITOMETRIA DE FLUXO

Inicialmente foram avaliados os linfócitos T CD4 dos camundongos não-submetidos ao enxerto. Dois animais de cada vez, um de cada grupo, foram avaliados por imunofluorescência direta e citometria de fluxo para expressão de CD45RB de superfície, CTLA4 de superfície, CTLA4 intracelular e IgG de hamster intracelular (usada como controle para a especificidade da fluorescência de CTLA4 intracelular). Os animais foram ainda avaliados quanto à presença do anticorpo monoclonal anti-CD45RB residual, quanto à interferência do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 na fluorescência para o anticorpo anti-CD45RB C36316A FITC usado na avaliação da expressão de CD45RB de superfície e quanto à expressão de marcadores de ativação linfocitária (CD25, CD44 e CD69).

Na sequência, foram avaliados os linfócitos T CD4 dos animais dos grupos submetidos ao transplante e sacrificados no 7º dia de pós-operatório. Analisaram-se 3 animais em cada um dos grupos II (controle, aloenxerto sem tratamento), III (aloenxertos tratados com anti-CD45RB), IV (aloenxertos tratados com anti-CTLA4) e V (aloenxertos tratados com a combinação de anti-CD45RB e anti-CTLA4). Os esplenócitos de cada animal foram isolados como descrito no item 3.1.6.1 (imunofluorescência indireta), sendo avaliados 2 animais de cada vez: inicialmente 1 animal do grupo II e 1 animal do grupo III, até terminarem os 3 animais de cada grupo e posteriormente 1 animal do grupo IV e 1 animal do grupo V, da mesma maneira. Verificou-se a expressão de CD45RB de superfície, CTLA4 de superfície, CTLA4 intracelular e IgG de hamster intracelular (usada como controle para a especificidade da fluorescência de CTLA4 intracelular).

3.7.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

3.7.1.1 CD45RB e CTLA4 de superfície e CTLA4 e IgG de hamster intracelular

A metodologia foi a mesma para os animais submetidos ou não a enxerto. Os esplenócitos do primeiro animal foram distribuídos em tubos de ensaio de 4,5 ml, numerados de 1 até 7, e os do segundo animal em 3 tubos, numerados de 5', 6' e 7' (cada um contendo 500.000 esplenócitos). Os tubos foram centrifugados a 1.400 rotações por minuto durante 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, foram adicionados ao precipitado 100 µl de PBS 1% e 1 µl dos seguintes anticorpos monoclonais anticamundongo: anti-CD45RB C363.16A conjugado com FITC a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA), anti-CTLA4 conjugado com PE a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA) e anti-CD4 conjugado com cy-chrome a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA), conforme se vê nas tabelas 8 e 9.

TABELA 8 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA CD45, CTLA4 E IgG DE HAMSTER NO GRUPO I

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Anticorpo	-	a	-	c	a+b+c	a+c	a+c

a - anti-CD45RB FITC; b - anti-CTLA4 PE; c - anti-CD4 cy-chrome.

TABELA 9 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA CD45, CTLA4 E IgG DE HAMSTER NO GRUPO II

	Tubo 5'	Tubo 6'	Tubo 7'
Anticorpo	a+b+c	a+c	a+c

a - anti-CD45RB FITC; b - anti-CTLA4 PE; c - anti-CD4 cy-chrome.

Na seqüência, os tubos, após incubados em gelo picado durante 20 minutos, receberam cada um 2 ml de PBS 1% e foram centrifugados a 1.400 rotações por minuto durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado dos tubos 1, 2, 4, 5 e 5' foi fixado com 400 µl de formaldeído a 2%, ficando prontos para a avaliação por citometria de fluxo. Aos tubos 3, 6, 7, 6' e 7' foi adicionado 1 ml de formaldeído a 2%, sendo eles incubados durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação

receberam 1 ml de saponina a 0,5% (Sigma, Boston, Massachusetts, EUA) e foram novamente incubados na temperatura ambiente durante 5 minutos – a saponina tem a finalidade de abrir poros na membrana celular, permitindo assim a passagem dos anticorpos para o interior da célula. Na sequência, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 1.400 rotações por minuto, desprezando-se o sobrenadante. Ao precipitado dos tubos 3, 6 e 6' foram adicionados 100 µl de PBS 1% e 1 µl do anticorpo monoclonal anti-CTLA4 PE a 0,2 mg/ml (coloração intracelular), e ao precipitado dos tubos 7 e 7' adicionou-se 1 µl de IgG de hamster a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA). Os tubos foram incubados na temperatura ambiente durante 1 hora, após a qual foram submetidos a 2 ciclos de lavagem com 1 ml de saponina 0,5 % e centrifugação a 1.400 rotações por minuto durante 5 minutos e em seguida a 1 ciclo de lavagem e centrifugação com 2 ml de PBS 1%. Por fim, os tubos foram fixados com 400 µl de formaldeído 2%.

Os tubos de número 1 a 4 foram usados para a regulação do citômetro de fluxo; os tubos 5 e 5', para avaliação da expressão de CD45RB e CTLA4 de superfície em linfócitos T CD4; os tubos 6 e 6', para avaliação da expressão de CD45RB de superfície e CTLA4 intracelular em linfócitos T CD4; os tubos 7 e 7', para avaliação da expressão de CD45RB de superfície e IgG de hamster intracelular em linfócitos T CD4.

3.7.1.2 Anti-CD45RB C36316A+MB23G2 e anti-CD45RB MB23G2 residual

Essa avaliação foi realizada somente nos animais não-submetidos a enxerto. Os esplenócitos, preparados conforme o item 3.7.1.1 e acondicionados nos tubos numerados de 8 e 9 (animal 1, grupo I) e 8'e 9'(animal 2, grupo II) receberam 1 µl dos seguintes anticorpos: anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC (GAR FITC) a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA), anti-CD45RB MB23G2 a 0,2 mg/ml e anti-CD4 cy-chrome a 0,2 mg/ml em uma primeira incubação e anti-CD45RB C36316A FITC a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA) em uma segunda incubação (somente os tubos 8 e 8'), conforme as tabelas 10 e 11.

TABELA 10 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA ANTI-CD45RB C36316A+MB23G2 E ANTI-CD45RB MB23G2 RESIDUAL NO GRUPO I

	Tubo 8	Tubo 9
Anticorpo	b+c+d	a+d

a – GAR FITC; b – anti-CD45RB MB23G2; c – anti-CD45RB C36316A; d – anti-CD4 cy-chrome.

TABELA 11 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA ANTI-CD45RB C36316A+MB23G2 E ANTI-CD45RB MB23G2 RESIDUAL NO GRUPO II

	Tubo 8'	Tubo 9'
Anticorpo	b+c+d	a+d

a – GAR FITC; b – anti-CD45RB MB23G2; c – anti-CD45RB C36316A; d – anti-CD4 cy-chrome.

3.7.1.3 Marcadores de ativação linfocitária (CD25, CD44 e CD69)

Essa avaliação foi realizada somente nos animais não-submetidos a enxerto. Os esplenócitos do primeiro animal (grupo I) foram distribuídos em tubos de ensaio de 4,5 ml numerados de 10 a 14 e os do segundo animal (grupo II) em tubos numerados de 12' a 14' (cada um contendo 500.000 esplenócitos). Os tubos foram centrifugados a 1.400 rotações por minuto durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Adicionaram-se ao precipitado 100 µl de PBS 1% e 1 µl dos seguintes anticorpos monoclonais anticamundongo (tabelas 10 e 11): anti-CD25 FITC a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA), anti-CD44 PE a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA), anti-CD69 FITC a 0,2 mg/ml (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, EUA) e anti-CD4 cy a 0,2 mg/ml, conforme as tabelas 12 e 13.

TABELA 12 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA NO GRUPO I

	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12	Tubo 13	Tubo 14
Anticorpo	a	b	a+d	b+d	c+d

a - anti-CD25 FITC; b - anti-CD44 PE; c - anti-CD69 FITC; d - anti-CD4 cy.

TABELA 13 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA NO GRUPO II

	Tubo 12'	Tubo 13'	Tubo 14'
Anticorpo	a+d	b+d	c+d

a - anti-CD25 FITC; b - anti-CD44 PE; c - anti-CD69 FITC; d - anti-CD4 cy.

Na sequência, os tubos, após incubados em gelo picado durante 20 minutos, receberam cada um 2 ml de PBS 1% e foram centrifugados a 1.400 rotações por minuto durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado foi fixado com 400 µl de formaldeído a 2%, ficando os tubos prontos para a avaliação por citometria de fluxo.

3.7.2 CITOMETRIA DE FLUXO

Os tubos foram avaliados no citômetro de fluxo “FacsCalibur” e os resultados avaliados pelo programa “Cell Quest”. Resultados abaixo de 3% do número total de linfócitos T CD4 na avaliação por citometria de fluxo foram considerados desprezíveis, levando-se em conta também as características de distribuição das células de acordo com sua fluorescência.

Em todos os tubos foi realizada inicialmente a avaliação dos esplenócitos de acordo com o seu tamanho. Essa avaliação foi feita medindo-se o tamanho das células através de visualização bidimensional: uma lateral (SSC-H) e uma frontal (FSC-H). Nessa população geral de células, os linfócitos T têm posição bem estabelecida, apresentando as menores dimensões tanto na visualização frontal quanto na lateral em relação às outras células, sendo então separados na região R1 conforme figuras 2A, 2D, 2G, 2I, 3A, 9A e 9C (essas figuras não representam todos os tubos avaliados).

3.7.2.1 Expressão de CD45RB, CTLA4 de superfície e CTLA4 e IgG de hamster intracelular

Nova avaliação foi feita nos tubos 1 a 7.

No tubo 1, primeiro mediu-se a fluorescência dos linfócitos (em R1) para CD45RB FITC (FL1-H) e para CTLA4 PE (FL2-H), conforme a figura 2B, e depois a fluorescência de CD45RB FITC (FL1-H) e CD4 cy-chrome (FL3-H), conforme a (figura 2C). Como nesse tubo não há anticorpos, ele é usado para determinação das células que não expressam os anticorpos usados na avaliação (células negativas).

No tubo 2, mediu-se a fluorescência dos linfócitos (em R1) para CD45RB-FITC (FL1-H, cor verde) em relação à fluorescência para CTLA4 PE (FL2-H, cor vermelha), conforme a figura 2E. Com isso realiza-se a compensação de cores (entre o

verde e o vermelho) através da regulagem da amperagem no citômetro de fluxo e determina-se a população de linfócitos com expressão de CD45RB de alto peso molecular, localizados na região R3 (figura 2F), e de baixo peso molecular, localizados na região R2 (figura 2F), fixando-se a linha vertical para determinação dos quadrantes que dividem essas duas populações (figura 2E). Os linfócitos presentes na região R4 da figura 2F são CD4 negativos (linfócitos CD8).

No tubo 3, mediu-se a expressão de CTLA4 PE intracelular (FL2-H, cor vermelha) nos linfócitos em relação à expressão de CD45RB FITC (FL1-H, cor verde), conforme a figura 2H. Com isso realiza-se a compensação de cores (entre o vermelho e o verde) através da regulagem da amperagem do citômetro de fluxo e determina-se a população de células expressando CTLA4 intracelular (em FL2-H), fixando-se a linha horizontal para determinação dos quadrantes que as dividem das células negativas (não expressam CTLA4 intracelular).

No tubo 4, para separar os linfócitos T CD4 da população geral de linfócitos fez-se a medição da fluorescência de CD4 cy-chrome (FL-3, cor azul) primeiro em relação à fluorescência de CD45FITC (FL-1, cor verde) e depois em relação à de CTLA4PE (FL-2, cor vermelha). Os linfócitos T CD4 foram separados dos linfócitos restantes dentro da região R2 (figura 2J) e da região R3 (figura 2K). Com essa avaliação foi realizada a compensação de cores do citômetro de fluxo entre o azul e o vermelho em FL2-H e entre o azul e o verde em FL1-H.

Com a linha vertical (determinada no tubo 2, figura 2E) e a horizontal (determinada no tubo 3, figura 2H) foram formados os quadrantes que forneceram os resultados da avaliação por citometria nos tubos contendo os três anticorpos (5 a 7 e 6' a 7'): quadrante inferior direito (QID), quadrante inferior esquerdo (QIE), quadrante superior direito (QSD) e quadrante superior esquerdo (QSE). As células expressando CD45RB de alto peso molecular ficaram contidas nos quadrantes superior direito e inferior direito; as células expressando CD45RB de baixo peso molecular ficaram contidas nos quadrantes superior esquerdo e inferior esquerdo; as células expressando CD45RB de alto peso molecular e CTLA4, no quadrante superior direito; as células expressando CD45RB de baixo peso molecular e CTLA4, no quadrante superior esquerdo.

Nos tubos 5 a 7 e 5' a 7' – que continham os três anticorpos – primeiro fez-se a medição para separar os linfócitos T CD4 dos restantes dentro da região R2 de maneira idêntica à figura 3B; novas medições, para avaliar a expressão de CD45RB FITC (FL-1) em relação a CTLA4 PE (FL-2) de superfície conforme (figuras 4A e 4B), a expressão de CD45RB FITC (FL-1) em relação a CTLA4 PE (FL-2) intracelular (figuras 5A e 5B) e a expressão de CD45RB FITC (FL-1) em relação a IgG de hamster PE (FL-2) intracelular (figuras 6A e 6B). As estatísticas com os resultados foram obtidas com base na avaliação dos quadrantes nessas últimas medições.

Nos tubos 5 e 5' foram avaliadas as percentagens de linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de alto e baixo peso molecular e as percentagens de linfócitos T CD4 com CD45RB de alto e baixo peso molecular que expressam CTLA4 em sua superfície (figuras 4A e 4B). Nos tubos 6 e 6' foram avaliadas as percentagens de linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de alto e baixo peso molecular e as percentagens de linfócitos T CD4 com CD45 de alto e baixo peso molecular que expressam CTLA4 intracelular (figuras 5A e 5B). Nos tubos 7 e 7' foram avaliadas as percentagens de linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de alto e baixo peso molecular e as percentagens de linfócitos T CD4 com CD45 de alto e baixo peso molecular que expressam IgG de hamster intracelular usada como controle para a expressão de CTLA4 intracelular (figuras 6A e 6B).

3.7.2.2 Expressão do anticorpo anti-CD45RB C36316A FITC+MB23G2

Essa quantificação foi realizada somente nos animais não-submetidos a enxerto. Na segunda avaliação nos tubos 8 e 8' foram separados os linfócitos T CD4 dentro da região R2, de maneira idêntica à mostrada na figura 3B. Na terceira avaliação analisou-se a expressão de anti-CD45RB (C36316A) FITC nos linfócitos T CD4. Nessa avaliação os linfócitos T CD4 expressando C36316A ficaram contidos em M1 (figuras 7A e 7B). Esses tubos foram incubados inicialmente com o anticorpo anti-CD45 MB23G2 com a finalidade de se verificar a influência desse anticorpo na fluorescência do anticorpo C36316A conjugado com FITC, também específico para o segmento B da molécula CD45.

3.7.2.3 Expressão do anticorpo anti-CD45RB MB23G2 residual

Essa quantificação foi realizada somente nos animais não-submetidos a enxerto. Na segunda avaliação nos tubos 9 e 9' foram separados os linfócitos T CD4 dentro da região R2, de maneira idêntica à mostrada na figura 3B. Na terceira avaliação analisou-se a expressão do anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC nos linfócitos T CD4. Nessa avaliação os linfócitos T CD4 negativos para GAR FITC ficaram contidos em M1 (figuras 8A e 8B). Esse anticorpo é expresso somente de maneira indireta nos linfócitos T CD4 que apresentam o anticorpo monoclonal anti-CD45RB residual na membrana (hibridoma proveniente de rato).

3.7.2.4 Expressão dos marcadores de ativação linfocitária (CD25, CD44 e CD69)

Essa quantificação foi realizada somente nos animais não-submetidos a enxerto. Antes do início da avaliação por citometria de fluxo, foram zeradas as amperagens usadas para a avaliação anterior, e novas amperagens foram determinadas para compensação das cores dos novos anticorpos conjugados utilizados (CD25 FITC, CD44 PE) nos tubos 10 e 11. A segunda avaliação no tubo 10 visou a determinação dos linfócitos positivos e negativos para CD25, estabelecendo-se uma linha vertical separando essas duas populações celulares (figura 9B). A segunda avaliação no tubo 11 visou a determinação da linha vertical que separa os linfócitos com alta ou baixa expressão de CD44, visto que quase não há células negativas para CD44, porque mais de 95% dos linfócitos expressam CD44 (figura 9D). Nos tubos 12 a 14 e 12' a 14' a segunda avaliação foi feita para separar os linfócitos T CD4 dentro da região R2 de maneira idêntica à mostrada na figura 3B.

Na terceira avaliação por citometria de fluxo nos tubos 12 (grupo I) e 12' (grupo II) determinou-se a expressão de CD25 nos linfócitos T CD4. Os linfócitos T CD4 que não expressavam CD25 ficaram localizados em M1 e os que o expressavam ficaram em M2 (figuras 10A e 10B).

Na terceira avaliação nos tubos 13 (grupo I) e 13' (grupo II) determinou-se a expressão de CD44 nos linfócitos T CD4. Os linfócitos T CD4 com baixa expressão de CD44 ficaram em M1 e os com alta expressão em M2 (figuras 11A e 11B).

Finalmente, na terceira avaliação nos tubos 14 (grupo I) e 14' (grupo II) determinou-se a expressão de CD69 nos linfócitos T CD4. Os linfócitos T CD4 que não expressavam CD69 ficaram localizados em M1 e os que o expressavam ficaram em M2 (figuras 12A e 12B).

3.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após a nefrectomia, as peças, seccionadas em um plano que passava através dos enxertos, foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em câmara fria a 80°C negativos. Sua coloração foi realizada no Laboratório de Imunogenética da Universidade de Yale e a análise histológica no Serviço de Patologia da Universidade de Yale. As técnicas de coloração utilizadas na avaliação histológica foram: hematoxilina e eosina para todos os enxertos obtidos e imuno-histoquímica para insulina nos enxertos dos animais dos grupos I e III que atingiram o 120º dia de pós-operatório e dos animais do grupo III que atingiram o 50º dia de pós-operatório do 2º transplante.

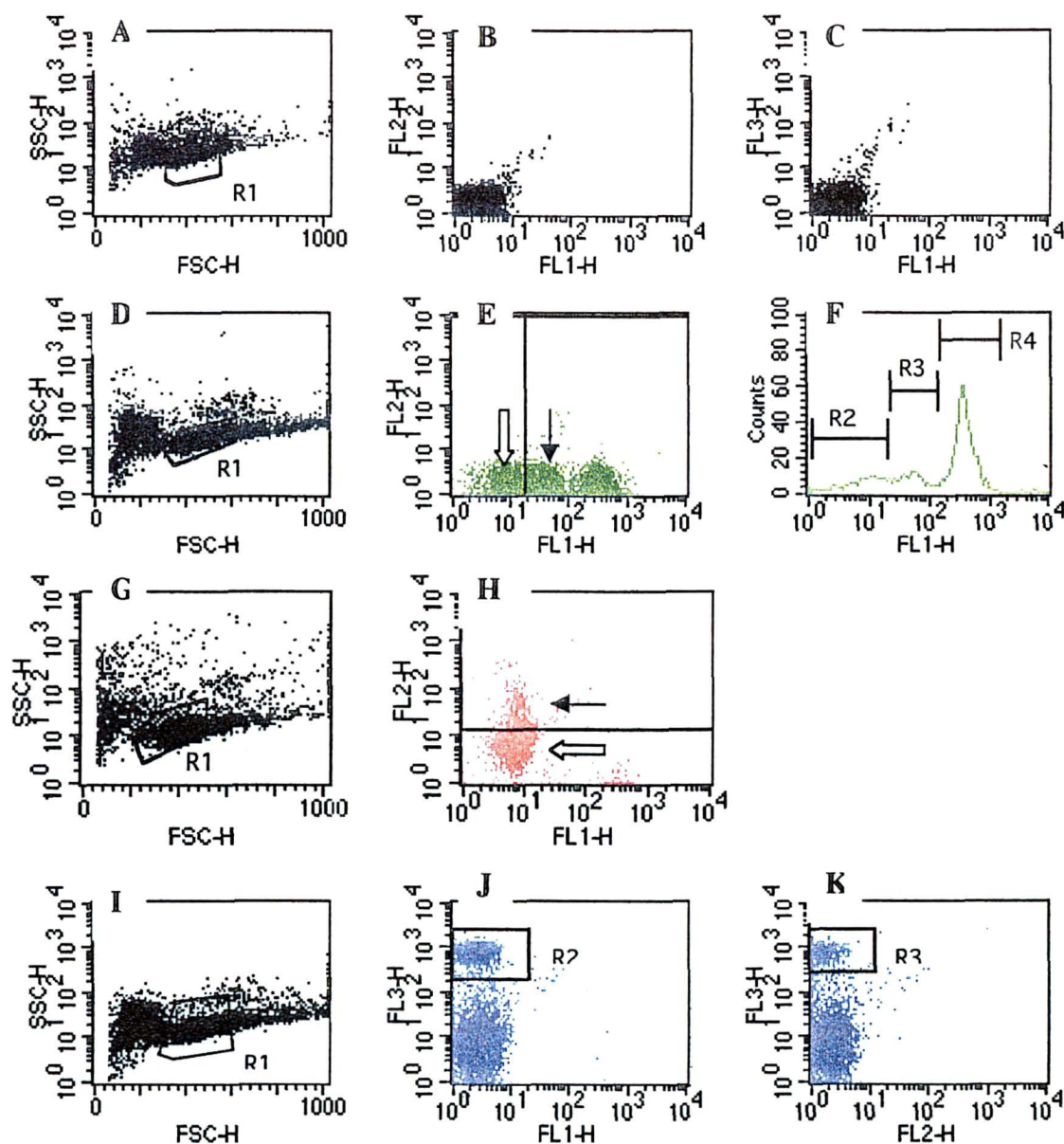
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada comparação dois a dois dos grupos de animais submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans em relação à variável tempo de sobrevida dos enxertos, utilizando-se o teste não-paramétrico de Cox-Mantel.

Para a análise dos dados obtidos com a citometria de fluxo dos linfócitos T CD4 para expressão de CD45RB, CTLA4, C363.16A FITC, GAR-FITC, CD25, CD44 e CD69 foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

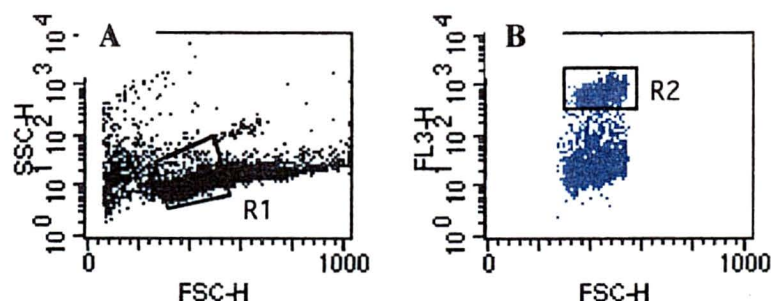
Em todos os testes considerou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Figura 2 – Citometria de fluxo grupo I (controle) tubos 1 a 4



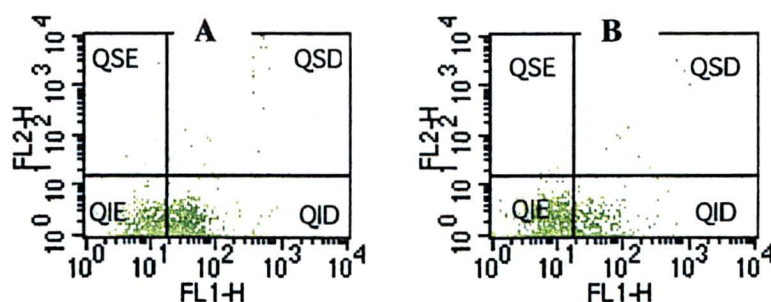
A, D, G, I (tubos 1, 2, 3 e 4 respectivamente) – População geral de esplenócitos; R1 – Linfócitos. B, C (tubo 1) – População de células negativas. E (tubo 2) – Expressão de CD45RB nos linfócitos. F (tubo 2) – Histograma da expressão de CD45RB nos linfócitos. (↓) e R3 – Linfócitos T CD4 com alta expressão de CD45RB; (↙) e R2 – linfócitos T CD4 com baixa expressão de CD45RB; R4 – linfócitos CD4 negativos. H (tubo 3) – Expressão de CTLA4 intracelular nos linfócitos (←); células negativas (↔). J (tubo 4) – Linfócitos T CD4 (R2). K (tubo 4) – Linfócitos T CD4 (R3). FSC-H – citometria frontal; SSC-H – citometria lateral; FL1-H – fluorescência para CD45RB FITC; FL2-H – fluorescência para CTLA4 PE; FL3-H – fluorescência para CD4 Cy-chrome.

Figura 3 – Linfócitos T CD4



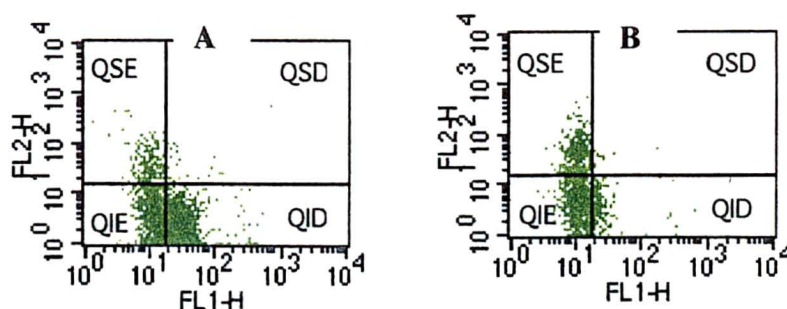
A - População geral de esplenócitos; R1 – Linfócitos. B – Linfócitos T CD4 (R2). FSC-H – citometria frontal; SSC-H – citometria lateral; FL3-H – fluorescência para CD4 Cy-chrome.

**Figura 4 – Expressão de CD45RB e CTLA4 de superfície (tubos 5 e 5')
Grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)**



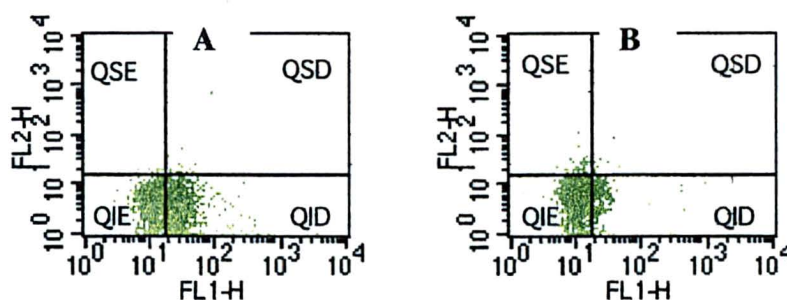
A e B (tubos 5 e 5' respectivamente) - Expressão de CD45RB e CTLA4 na superfície de linfócitos T CD4. QIE+QSE- linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular; QID+QSD- linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; QSE- linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando CTLA4 de superfície; QSD- linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular expressando CTLA4 de superfície. FSC-H- citometria frontal; SSC-H- citometria lateral; FL1-H- fluorescência para CD45RB FITC; FL2-H- fluorescência para CTLA4 PE; QSE- quadrante superior esquerdo; QSD – quadrante superior direito; QID – quadrante inferior direito.; QIE – quadrante inferior esquerdo.

**Figura 5 – Expressão de CD45RB e CTLA4 intracelular (tubos 6 e 6')
Grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)**



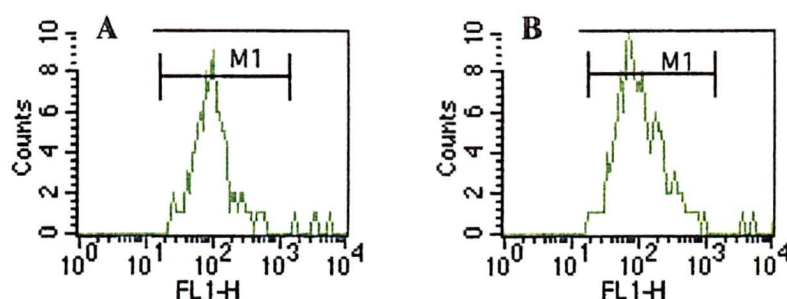
A e B (tubos 6 e 6' respectivamente) - Expressão de CD45RB de superfície e CTLA4 intracelular em linfócitos T CD4. QIE+QSE - linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular; QID+QSD - linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; QSE - linfócitos CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando CTLA4 intracelular; QSD - linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular expressando CTLA4 intracelular. FSC-H - citometria frontal; SSC-H - citometria lateral; FL1-H - fluorescência para CD45RB FITC; FL2-H - fluorescência para CTLA4 PE; QSE - quadrante superior esquerdo; QSD - quadrante superior direito; QID - quadrante inferior direito.; QIE - quadrante inferior esquerdo.

**Figura 6 – Expressão de CD45RB e IgG de hamster intracelular (tubos 7 e 7')
Grupo I (controle) grupo II (anti-CD45RB)**



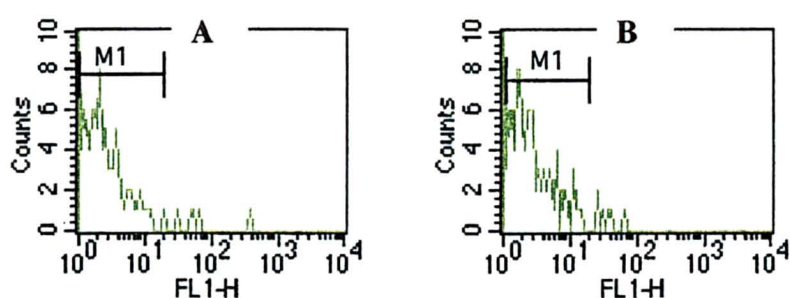
A e B (tubos 7 e 7' respectivamente) - Expressão de CD45RB de superfície e IgG de hamster intracelular em linfócitos T CD4. QIE+QSE - linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular; QID+QSD - linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; QSE - linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando IgG de hamster intracelular; QSD - linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular expressando IgG de hamster intracelular. FSC-H - citometria frontal; SSC-H - citometria lateral; FL1-H - fluorescência para CD45RB FITC; FL2-H - fluorescência para hamster IgG PE; QSE - quadrante superior esquerdo; QSD - quadrante superior direito; QID - quadrante inferior direito.; QIE - quadrante inferior esquerdo.

Figura 7 – Expressão de anti-CD45RB (MB23G2 + C36316A FITC) tubos 8 e 8’ grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)



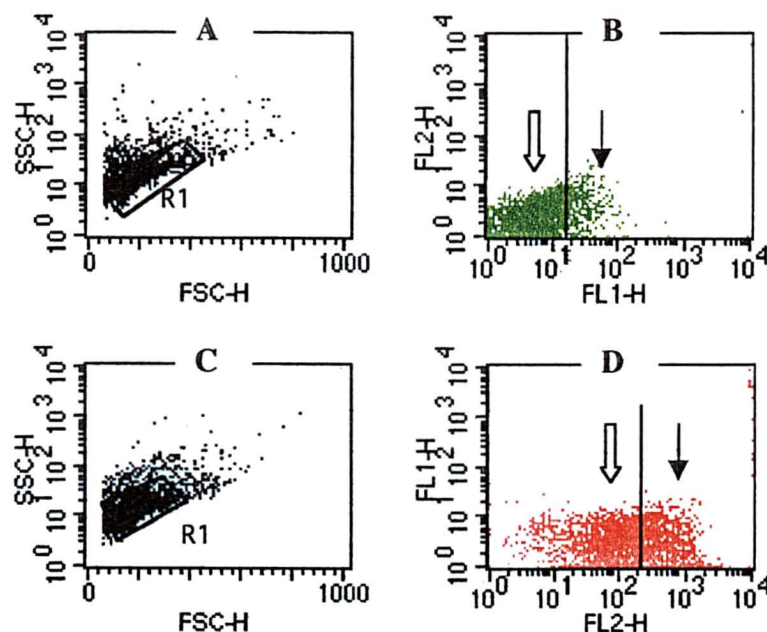
A e B (tubos 8 e 8’ respectivamente) - Expressão de C36316A FITC nos linfócitos T CD4; M1 - linfócitos T CD4 expressando C36316A FITC. Counts – número de células; FL1-H - fluorescência para C36316A FITC .

Figura 8 - Expressão de GAR FITC (tubos 9 e 9’) grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)



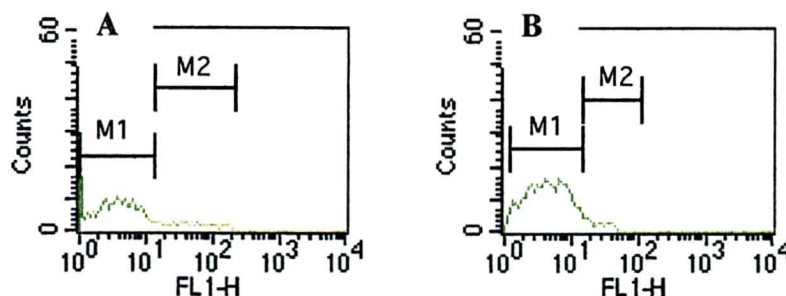
A e B (tubos 9 e 9’ respectivamente) – Expressão de anticorpo de cabra anti-rato FITC (GAR FITC) nos linfócitos T CD4; M1 – linfócitos T CD4 negativos para expressão de GAR FITC. Counts – número de células; FL1-H - fluorescência para GAR FITC.

Figura 9 – Citometria de fluxo tubos 10 e 11 (grupo I controle)



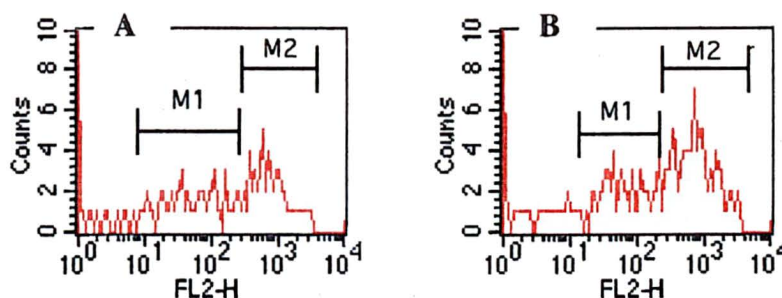
A e C (tubos 10 e 11 respectivamente) – população geral de esplenócitos; R1 – Linfócitos. B (tubo 10) – Expressão de CD25 FITC nos linfócitos. ↓ – linfócitos negativos para CD25; ↓ – linfócitos expressando CD25. D (tubo 11) – expressão de CD44 PE nos linfócitos. ↓ – linfócitos com baixa expressão de CD44; ↓ – linfócitos Com alta expressão de CD44. FSC-H – citometria frontal; SSC-H – citometria lateral; FL1-H – fluorescência para CD25 FITC; FL2-H – fluorescência para CD44 PE.

**Figura 10 – Expressão de CD25 (tubos 12 e 12')
Grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)**



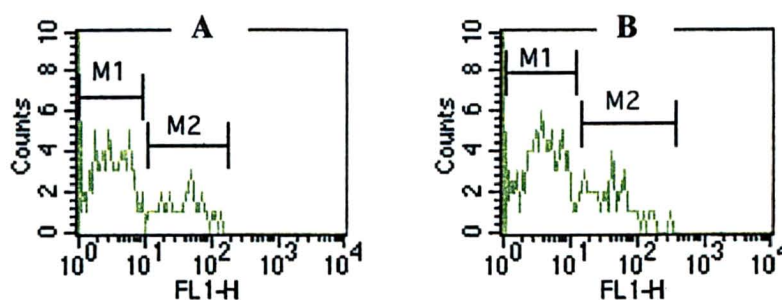
A e B (tubos 12 e 12' respectivamente) – Expressão de CD25 FITC nos linfócitos T CD4. M1 – linfócitos T CD4 negativos para CD25 FITC; M2 – linfócitos T CD4 positivos para CD25 FITC. Counts – número de células; FL1-H - fluorescência para CD25 FITC.

Figura 11 – Expressão de CD44 (tubos 13 e 13')
Grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)



A e B (tubos 13 e 13' respectivamente) – Expressão de CD44 PE nos linfócitos T CD4. M1 – linfócitos T CD4 com baixa expressão de CD44PE; M2 – linfócitos T CD4 com alta expressão de CD44PE. Counts – número de células; FL2-H - fluorescência para CD44PE.

Figura 12 – Expressão de CD69 (tubos 14 e 14')
Grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)



A e B (tubos 14 e 14' respectivamente) – Expressão de CD69 FITC nos linfócitos T CD4. M1 – linfócitos T CD4 negativos para CD69 FITC; M2 – linfócitos T CD4 positivos para CD69 FITC. Counts – número de células; FL1-H - fluorescência para CD69 FITC.

4 RESULTADOS

4.1 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

4.1.1 ESPECTROFOTOMETRIA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB APÓS COLETA DA COLUNA PROTEÍNA G

Os resultados da espectrofotometria dos 17 tubos (1 e 2 são controle, referência 0 no aparelho) após coleta dos anticorpos na coluna de proteína G estão demonstrados na tabela 14. Foram selecionados os tubos 6 até 16 por apresentarem significativa quantidade de proteína, com valor médio igual a 0,52. A concentração de anticorpos monoclonais anti-CD45RB foi igual a 0,39 mg/ml ($0,52 \times 0,75$). O volume contido nos tubos 6 até 16 foi de 23 ml. A quantidade de anti-CD45RB foi de 8,97 mg.

TABELA 14 – ESPECTROFOTOMETRIA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB APÓS COLUNA PROTEÍNA G

Tubo	E		Tubo	E		Tubo	E
1	0		7	0,939		13	0,284
2	0		8	0,725		14	0,245
3	0,011		9	0,579		15	0,232
4	0,008		10	0,477		16	0,207
5	0,043		11	0,386		17	0,185
6	0,981		12	0,335			

E – valor no espectrofotômetro.

4.1.2 ESPECTROFOTOMETRIA DA IgG PADRÃO E ANTI-CD45RB

Os resultados da espectrofotometria da IgG padrão e do anticorpo anti-CD45RB, ambos em diferentes concentrações, estão na tabela 15 e tabela 16 respectivamente.

TABELA 15 – ESPECTROFOTOMETRIA DA IgG PADRÃO

IgG	0	25 %	50 %	75 %	100 %
E	0	0,237	0,384	0,543	0,689

IgG – concentração de IgG; E – resultado da espectrofotometria.

TABELA 16 – ESPECTROFOTOMETRIA DO ANTICORPO ANTI-CD45RB

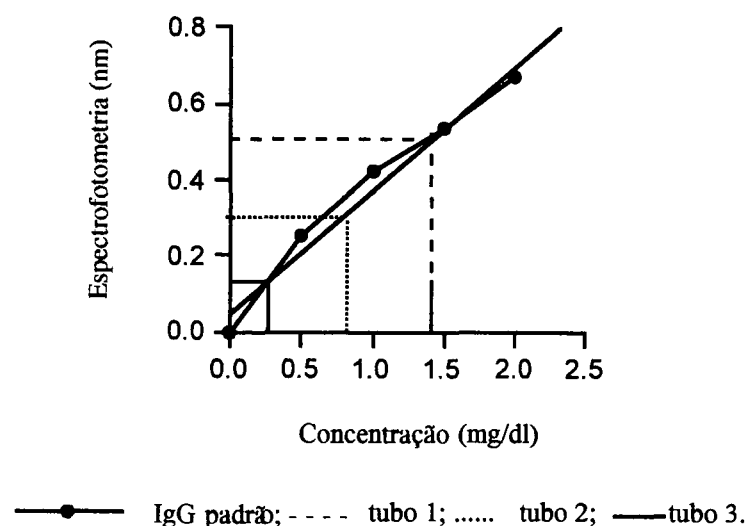
Anti-CD45RB	25 %	50 %	100 %
E	0,200	0,316	0,562

Anti-CD45RB – concentração de anti-CD45RB; E – resultado da espectrofotometria.

4.1.3 RELAÇÃO DA ESPECTROFOTOMETRIA COM A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A relação dos valores medidos no espectrofotômetro com os valores reais da concentração de IgG padrão está demonstrada no gráfico 1, assim como a relação dos valores medidos no espectrofotômetro com a concentração real do anticorpo anti-CD45RB.

GRÁFICO 1 – RELAÇÃO DA IgG PADRÃO COM A CONCENTRAÇÃO DE ANTI-CD45RB



A tabela 17 mostra os resultados para a concentração de anti-CD45RB nas 3 diferentes titulações e sua multiplicação pelos fatores de conversão, determinando as concentrações reais do anticorpo. A concentração final de anti-CD45RB, igual a 1,73 mg/ml, é a média dos três resultados.

TABELA 17 – CONCENTRAÇÃO DE ANTI-CD45RB

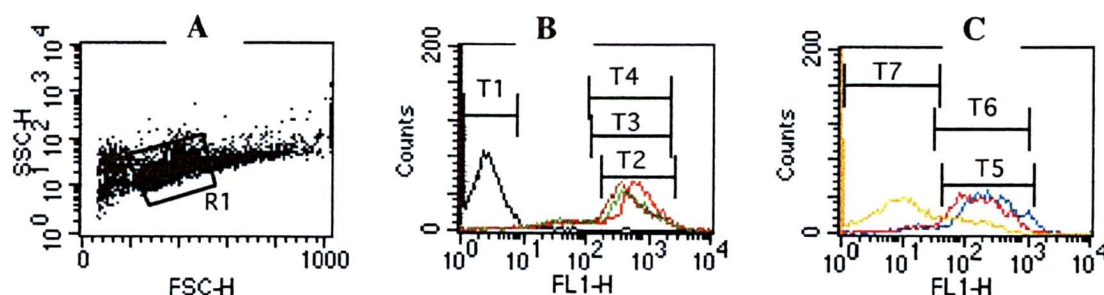
Titulação	Concentração	Fator Conversão	Concentração real
25%	0,5 mg/ml	4	2,0 mg/ml
50%	0,8 mg/ml	2	1,6 mg/ml
100%	1,6 mg/ml	1	1,6 mg/ml

Anti-CD45RB – anticorpo monoclonal anti-CD45RB

4.1.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados da avaliação por imunofluorescência indireta e citometria de fluxo para verificação da especificidade do anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 estão demonstrados na figura 13. “A” mostra a população geral de células isoladas do baço em uma avaliação bidimensional – visão lateral (SSC-H) e visão frontal (FSC-H) – sendo selecionados na região R1 os linfócitos. Essa representação dos esplenócitos e linfócitos corresponde somente ao tubo 1. Os valores correspondentes ao número de células representadas em R1 nos 7 tubos estão na tabela 18. Nas figuras 13B e 13C, FL1-H mostra a fluorescência para o anticorpo secundário (anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC) ligado ao anticorpo primário (anti-CD45RB) específico para o segmento B do receptor CD45. A fluorescência em FL1-H está demonstrada nas diferentes concentrações (tubos 1 até 7), observando-se significativa diminuição da fluorescência somente no tubo 7 (com menor concentração de anticorpo primário).

FIGURA 13 - CITOMETRIA DE FLUXO (IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA)



A – População geral de eplénócitos do tubo número 1 (tubos número 2, 3, 4, 5, 6 e 7 não demonstrados) ; R1 – Linfócitos. B – expressão indireta de CD45RB nos linfócitos: T1 (preto), tubo número 1; T2 (vermelho), tubo número 2; T3 (verde), tubo número 3; T4 (marrom), tubo número 4. C – expressão indireta de CD45RB nos linfócitos: T5 (azul), tubo número 5; T6 (magenta), tubo número 6; T7 (amarelo), tubo número 7. FSC-H – citometria frontal; SSC-H – citometria lateral; FL1-H – fluorescência para o anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC (em escala logarítmica); counts – número de células.

TABELA 18 – IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA E CITOMETRIA DE FLUXO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
R1	8.234	6.447	5.970	6.553	7.889	7.632	8.402
T	8.179	5.070	4.776	5.627	7.099	7.155	2.281
(%)	(99,33%)	(78,64%)	(80%)	(85,87%)	(89,99%)	(93,75%)	(27,15%)

R1 – linfócitos; T – número de linfócitos expressando (tubos 2 até 7) ou não (tubo 1) o complexo de anticorpos (anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC e anti-CD45RB).

4.2 INDUÇÃO DE DIABETE QUÍMICA

A glicemia dos animais nos diferentes grupos medida 1 semana após a injeção de estreptozocina e imediatamente antes do transplante está representada no anexo 1.

4.3 SOBREVIDA DOS ENXERTOS

4.3.1 PRIMEIRO TRANSPLANTE

Os gráficos 2 e 3 representam o percentual cumulativo de sobrevida dos enxertos dos animais dos grupos I, II, III, IV e V. Os valores dos níveis glicêmicos medidos 1 semana após a administração de estreptozocina, no período pré-operatório imediato, no pós-operatório dos grupos I, II, III, IV e V e após a nefrectomia esquerda nos animais dos grupos I e III estão expressos nos anexos 2 a 6.

GRÁFICO 2 – PERCENTUAL CUMULATIVO DE SOBREVIDA DOS ENXERTOS GRUPO I E II

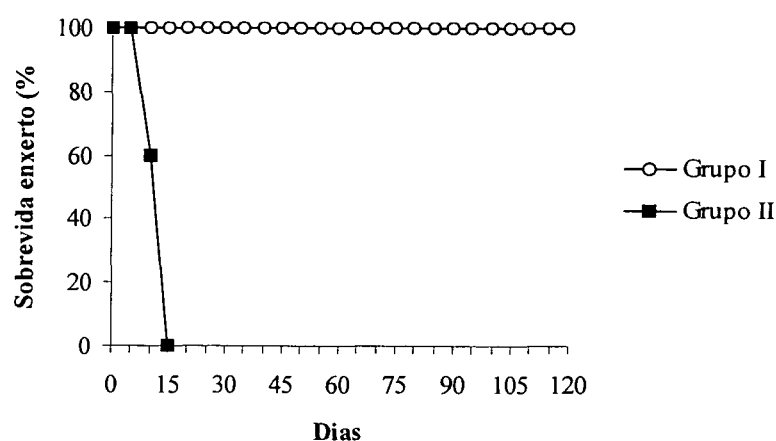
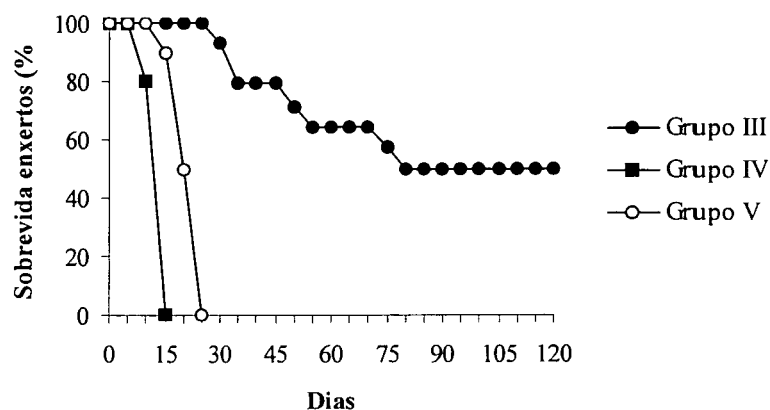


GRÁFICO 3 – PERCENTUAL CUMULATIVO DE SOBREVIDA DOS ENXERTOS GRUPOS III, IV E V

A análise estatística pelo teste de Cox-Mantel demonstrou diferença significativa da sobrevivência dos enxertos entre os grupos II e III ($p < 0,0001$), II e V ($p = 0,00023$) e III e V ($p < 0,0001$). O grupo IV apresentou sobrevivência estatisticamente igual à do grupo II ($p = 0,2563$).

4.3.2 SEGUNDO TRANSPLANTE

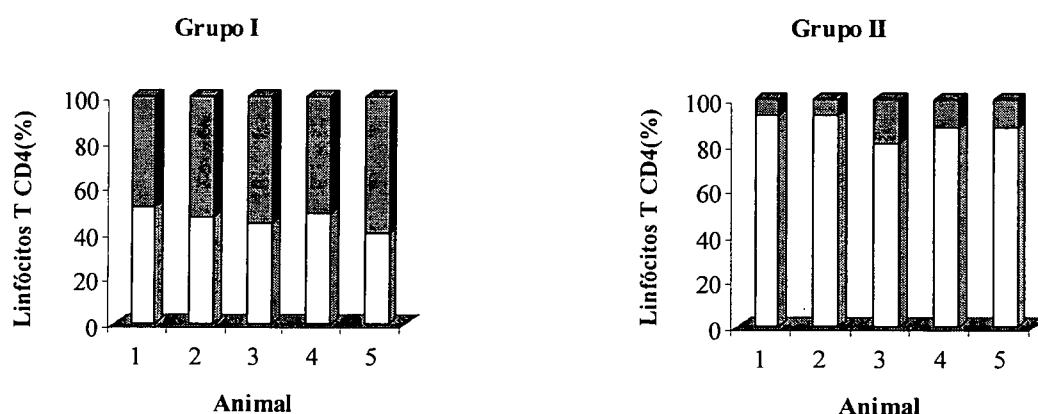
Sete animais do grupo III atingiram o 120º dia de pós-operatório apresentando níveis normais de glicemia, e hiperglicemia após a nefrectomia esquerda. Desses, 4 foram submetidos a um 2º transplante com ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos BALB/c, e 3 animais a um 2º transplante com ilhotas de camundongos CBA/H. Dos 4 animais submetidos a um 2º transplante com ilhotas de Langerhans provenientes de camundongos BALB/c, 3 permaneceram euglicêmicos até o 50º dia de pós-operatório e 1 apresentou rejeição no 25º dia de pós-operatório. Dos 3 animais que receberam um 2º enxerto com ilhotas provenientes de camundongos CBA, 2 apresentaram rejeição no 10º dia e 1 no 15º dia de pós-operatório. A glicemia dos animais submetidos ao 2º transplante está mostrada no anexo 4.

4.4 EXPRESSÃO DE CD45, CTLA4 E IgG DE HAMSTER

4.4.1 ANIMAIS NÃO-SUBMETIDOS A ENXERTO

Os resultados da citometria de fluxo das regiões avaliadas nos tubos número 1 até 7 para o grupo I (controle) e 5' a 7' para o grupo II (anti-CD45RB) estão representados no anexo 7. A expressão de CD45RB nos linfócitos T CD4 de animais do grupo I (controle) e do grupo II (tratados com anti-CD45RB) estão representados no gráfico 4. Esses resultados representam a média entre os tubos número 5 a 7 para os animais do grupo I e 5'a 7' para os animais do grupo II. Os resultados dos quadrantes avaliados em cada tubo isoladamente podem ser vistos no anexo 8, e os valores para R2 (número de linfócitos T CD4 avaliados) nos 6 tubos – 5 a 7 para cada animal do grupo I e 5' a 7' para cada animal do grupo II – estão no anexo 7. O aumento do número de linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular no grupo II foi significativo ($p=0,0040$).

**GRÁFICO 4 – EXPRESSÃO DE CD45RB NOS LINFÓCITOS T CD4
GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)**

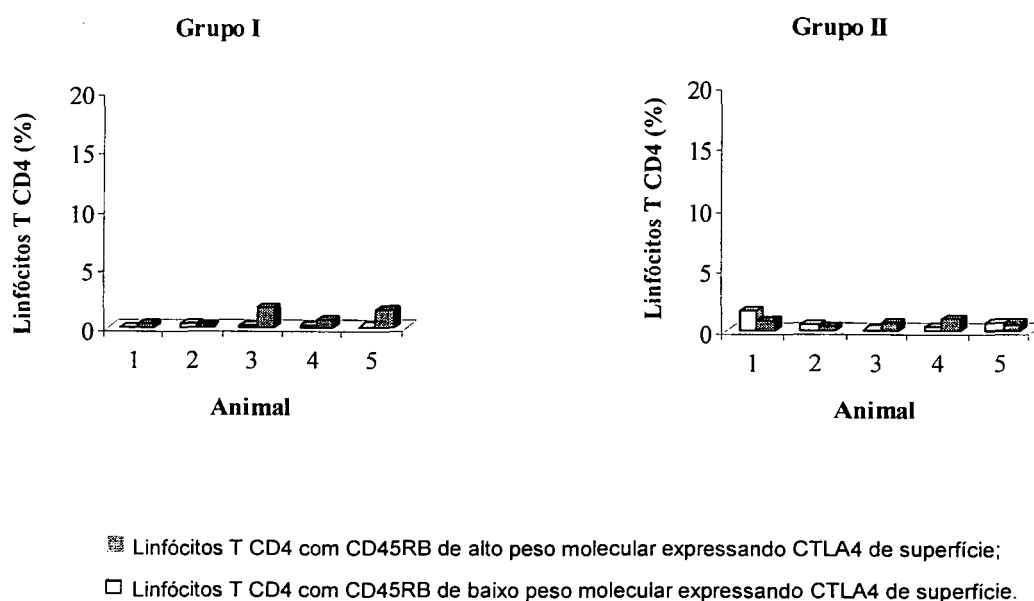


■ Linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular;

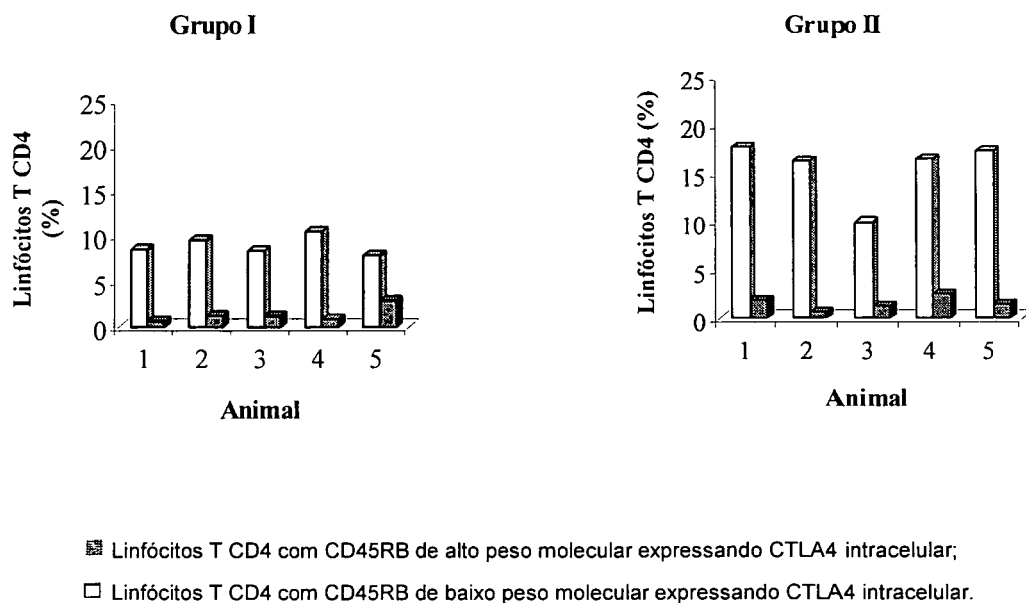
□ linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

No gráfico 5 estão representados os resultados da citometria de fluxo da expressão de CTLA4 de superfície nos linfócitos T CD4 com CD45 de alto e baixo peso molecular dos animais do grupo I (controle) e do grupo II (tratados com anti-CD45RB). Essa expressão não foi considerada significativa na citometria de fluxo. O número de linfócitos T CD4 avaliados e os valores numéricos das porcentagens estão mostrados no anexo 9.

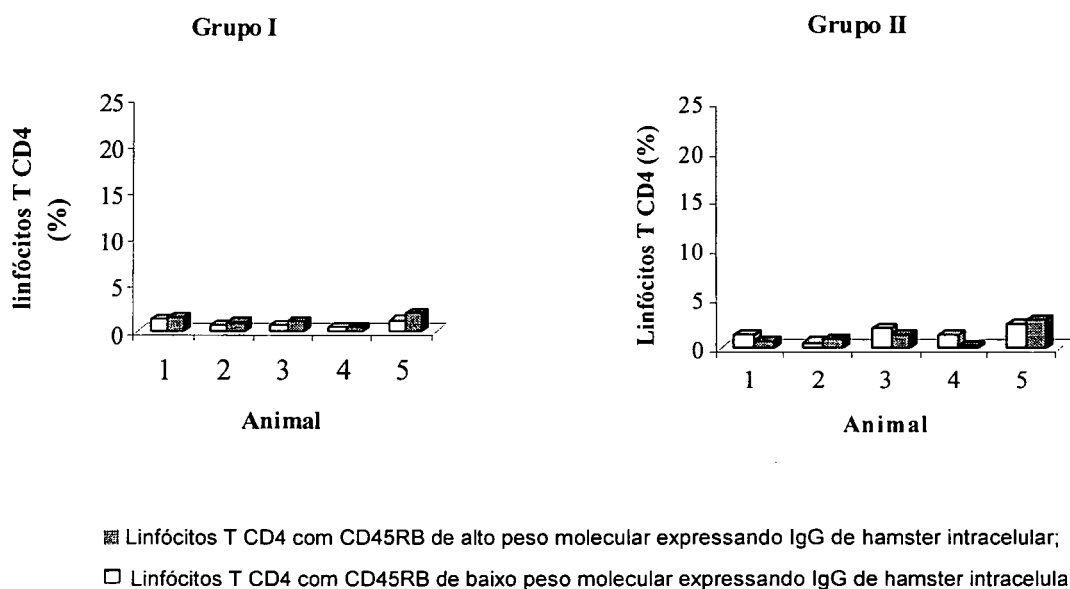
GRÁFICO 5 – EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE NOS LINFÓCITOS T CD4 COM CD45RB DE ALTO E BAIXO PM



Os resultados da citometria de fluxo para avaliação da expressão de CTLA4 intracelular nos linfócitos T CD4 apresentando CD45RB de alto e baixo peso molecular dos animais do grupo I (controle) e do grupo II (tratados com anti-CD45RB) mostram que o aumento do número de linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando CTLA4 intracelular foi estatisticamente significativo ($p=0,0080$) (gráfico 6). Os resultados da expressão de CTLA4 intracelular nos linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular não foram considerados significativos na citometria de fluxo. O número de linfócitos T CD4 avaliados e os valores numéricos das porcentagens estão mostrados no anexo 10.

GRÁFICO 6 – EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4

A expressão de IgG de hamster intracelular nos linfócitos T CD4 apresentando CD45RB de alto e baixo peso molecular dos animais do grupo I (controle) e do grupo II (tratados com anti-CD45RB) não foi considerada significativa na citometria de fluxo (gráfico 7). O número de linfócitos T CD4 avaliados e os valores numéricos das porcentagens estão no anexo 11.

GRÁFICO 7 – EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4

4.4.2 ANIMAIS SUBMETIDOS A ENXERTO

Os resultados da citometria de fluxo para avaliação inicial dos esplenócitos e das regiões nos tubos número 1 até 7 dos animais dos grupos II (controle) e IV (anti-CTLA4) e nos tubos 5' a 7' dos animais dos grupos III (anti-CD45RB) e V (anti-CD45RB+anti-CTLA4) estão representados no anexo 12 e 13.

Os resultados da citometria de fluxo da expressão de CD45RB nos linfócitos T CD4 avaliados no grupo II (aloenxertos sem tratamento), grupo III (tratados com anti-CD45RB), grupo IV (tratados com anti-CTLA) e grupo V (tratados com a combinação anti-CD45RB e anti-CTLA4) estão representados nos gráficos 8 e 9. Esses resultados representam a média entre os tubos número 5 a 7 para os animais dos grupos II e IV e 5' a 7' para os animais dos grupos III e V. Os resultados dos tubos isoladamente e porcentagens estão nos anexos 14 e 15.

Houve diferença estatística no aumento do número de linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular observado no grupo III em relação ao grupo II ($p=0,0500$), no grupo III em relação ao grupo IV ($p=0,0500$) e no grupo V em relação ao grupo II ($p=0,0500$). O grupo IV apresentou expressão de CD45RB estatisticamente igual à do grupo II ($p=0,1000$).

**GRÁFICO 8 – EXPRESSÃO DE CD45RB EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO II (CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)**

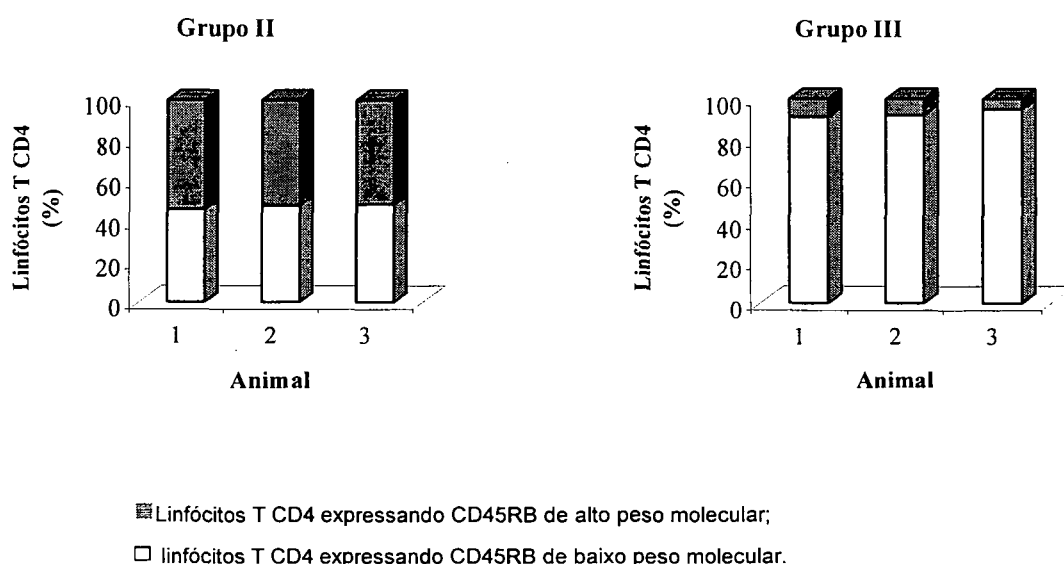
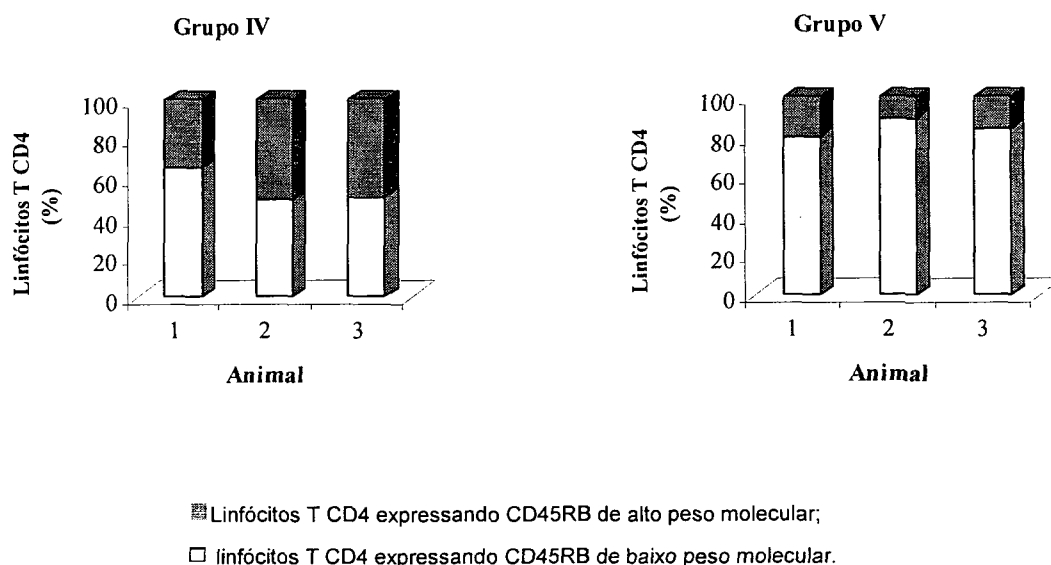


GRÁFICO 9 – EXPRESSÃO DE CD45RB EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)



Os resultados da citometria de fluxo da expressão de CTLA4 de superfície (tubos número 5 e 5') nos linfócitos T CD4 apresentando CD45RB de alto e baixo peso molecular dos animais do grupo II (aloenxertos sem tratamento), grupo III (tratados com anti-CD45RB), grupo IV (tratados com anti-CTLA4) e grupo V (tratados com a combinação anti-CD45RB e anti-CTLA4) não foram considerados significativos na citometria de fluxo (gráficos 10 e 11). O número de linfócitos T CD4 avaliados e o resultado das porcentagens estão nos anexos 16 e 17.

GRÁFICO 10 – EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)

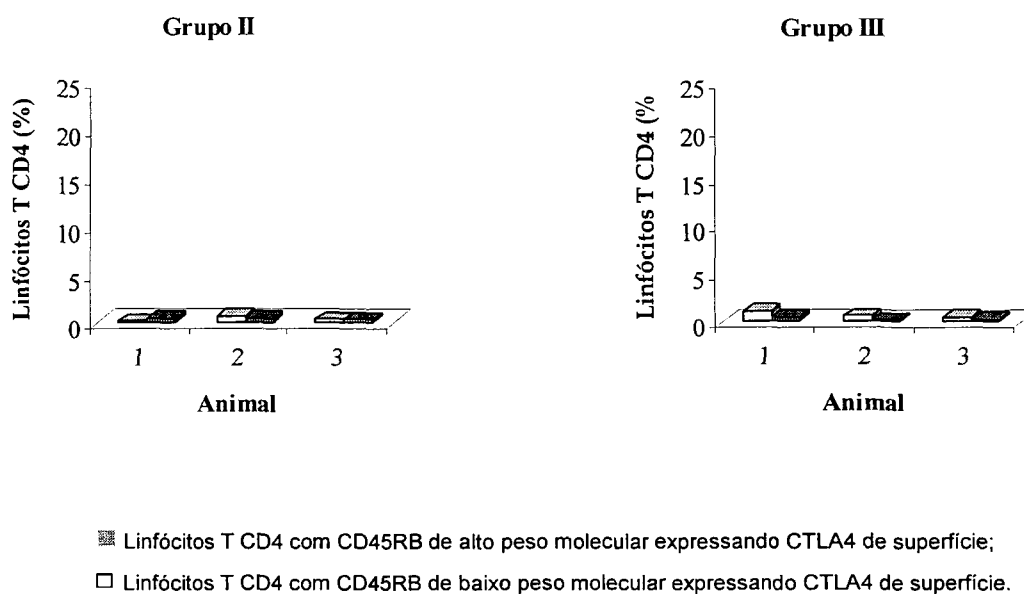
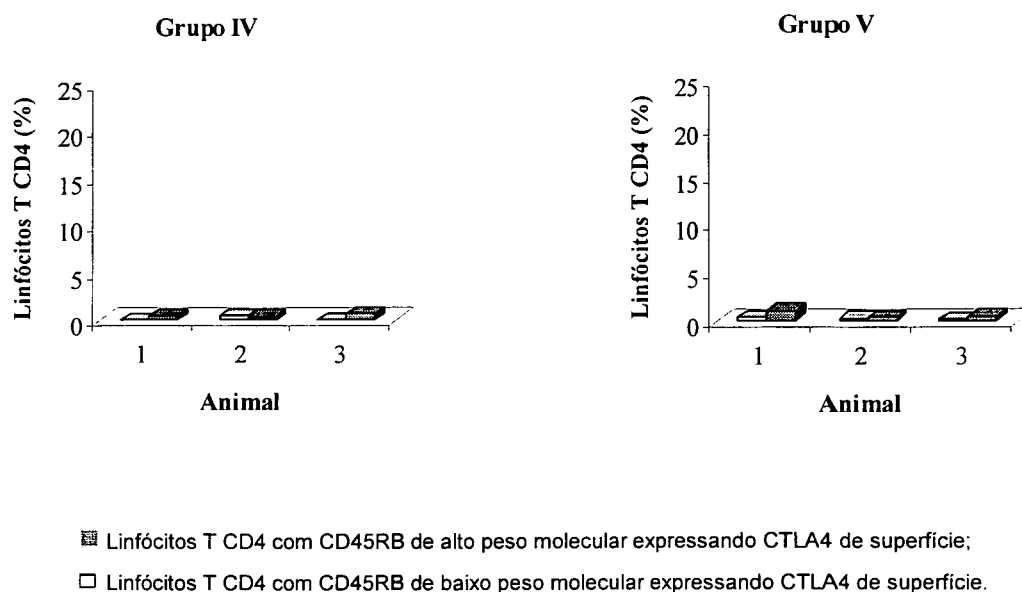


GRÁFICO 11 – EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)



Os resultados da citometria de fluxo da expressão de CTLA4 intracelular (tubos número 6 e 6') nos linfócitos T CD4 apresentando CD45RB de alto e baixo peso molecular dos animais do grupo II (aloenxertos sem tratamento), grupo III (tratados com anti-CD45RB), grupo IV (tratados com anti-CTLA) e grupo V (tratados com a combinação anti-CD45RB e anti-CTLA4) estão representados nos gráficos 12 e 13 e anexos 18 e 19.

GRÁFICO 12 – EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)

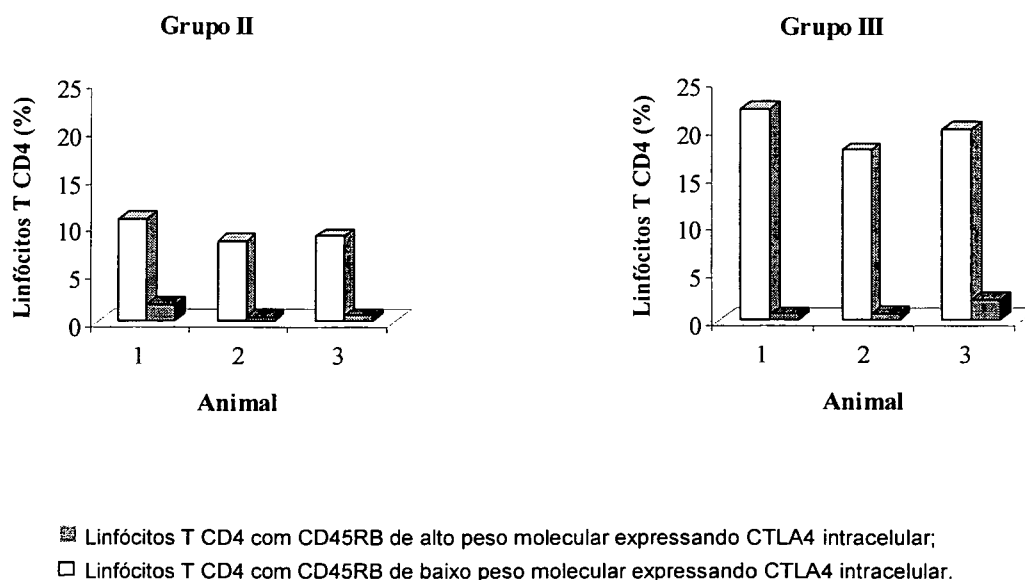
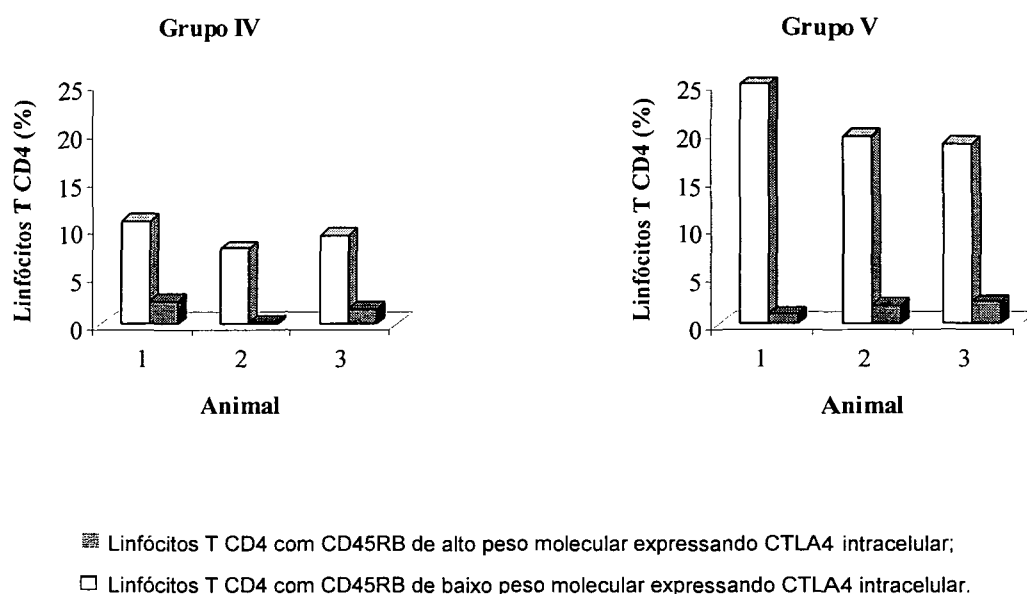


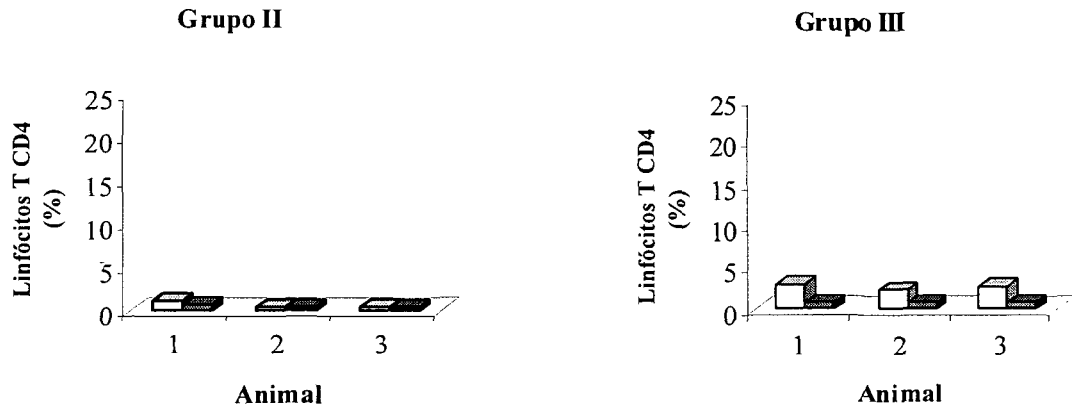
GRÁFICO 13 – EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)



Houve diferença estatística no aumento de linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando CTLA4 intracelular no grupo III em relação ao grupo II ($p=0,0500$) e no grupo V em relação ao grupo II ($p=0,0500$). O grupo IV apresentou expressão de CTLA4 intracelular estatisticamente igual à do grupo II ($p=1,0000$), ocorrendo o mesmo no grupo V em relação ao grupo III ($p=0,6500$). A expressão de CTLA4 intracelular nos linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular foi considerada desprezível pela análise por citometria de fluxo.

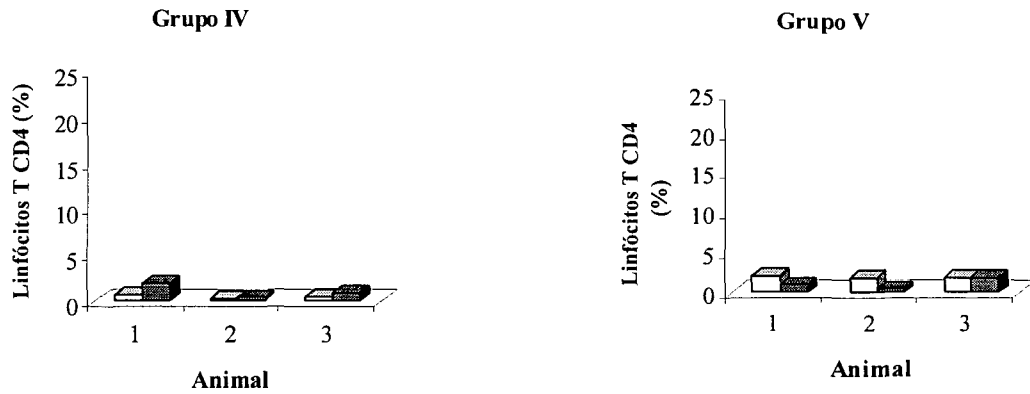
Os resultados da citometria de fluxo da expressão de IgG de hamster intracelular (tubos número 7 e 7') nos linfócitos T CD4 apresentando CD45RB de alto e baixo peso molecular dos animais do grupo II (aloenxertos sem tratamento), grupo III (tratados com anti-CD45RB), grupo IV (tratados com anti-CTLA4) e grupo V (tratados com a combinação anti-CD45RB e anti-CTLA4) não foram considerados significativos na análise por citometria de fluxo (ver gráficos 14 e 15 e anexos 20 e 21).

GRÁFICO 14 – EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)



■ Linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular expressando IgG de hamster intracelular;
□ Linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando IgG de hamster intracelular.

GRÁFICO 15 – EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4 GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

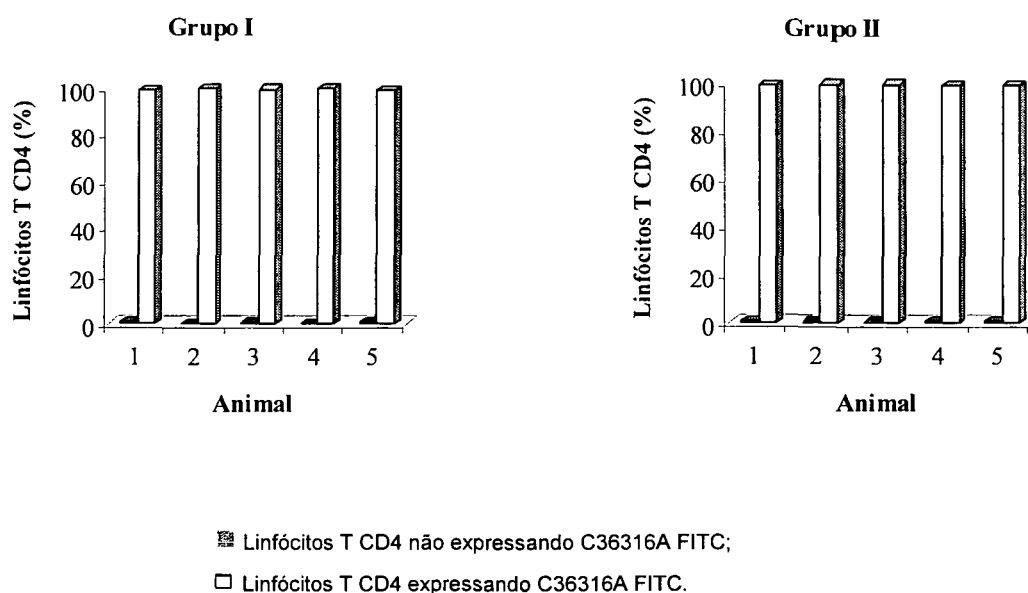


■ Linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular expressando IgG de hamster intracelular;
□ Linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressando IgG de hamster intracelular.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ANTI-CD45RB C36316A FITC + MB23G2

Estes resultados referiu-se a animais não-submetidos a enxerto. Os resultados da citometria de fluxo para avaliação da expressão de anti-CD45RB (C36316A FITC) em linfócitos T CD4 em animais do grupo I (controle) e do grupo II (anti-CD45RB) incubados em conjunto com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB (MB23G2) estão no gráfico 16. Os resultados para o total de esplenócitos, linfócitos e linfócitos T CD4 avaliados em cada animal estão no anexo 7 e as porcentagens no anexo 22.

GRÁFICO 16 – EXPRESSÃO DE ANTI-CD45RB (C36316A FITC)



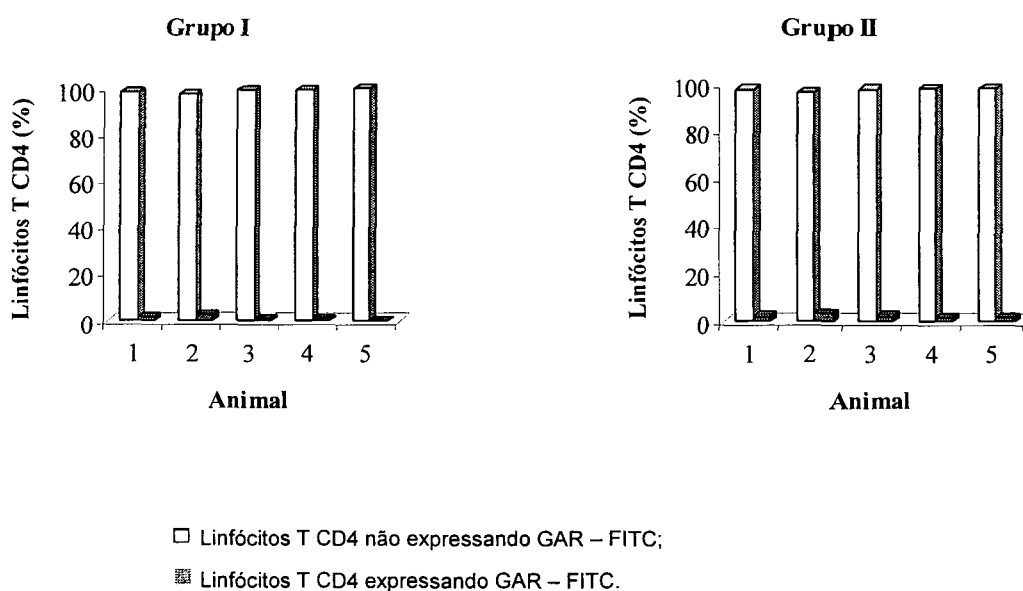
A análise estatística demonstrou igualdade no número de linfócitos T CD4 C363.16A FITC positivos nos 2 grupos ($p=0,3100$). O número de linfócitos T CD4 C363.16A negativos não foi considerado significativo na análise por citometria de fluxo.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPO RESIDUAL

Estes resultados referem-se a animais não-submetidos a enxerto. Os resultados da citometria de fluxo para avaliação da presença do anticorpo anti-CD45RB residual em linfócitos T CD4 com anticorpos de cabra anti-rato conjugado com FITC (GAR-FITC)

após 8 dias da primeira injeção endovenosa nos grupos I (controle) e II (anti-CD45RB) estão representados no gráfico 17. Os resultados referentes ao número total de esplenócitos, linfócitos e linfócitos T CD4 avaliados estão no anexo 7 e as porcentagens no anexo 23.

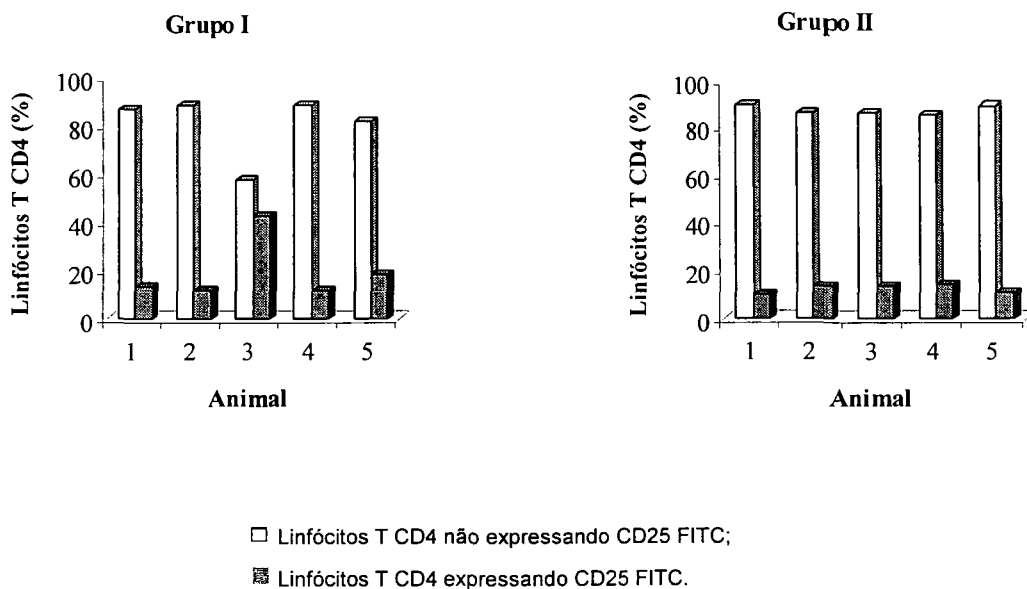
GRÁFICO 17 – EXPRESSÃO DE GAR-FITC (8º DIA)



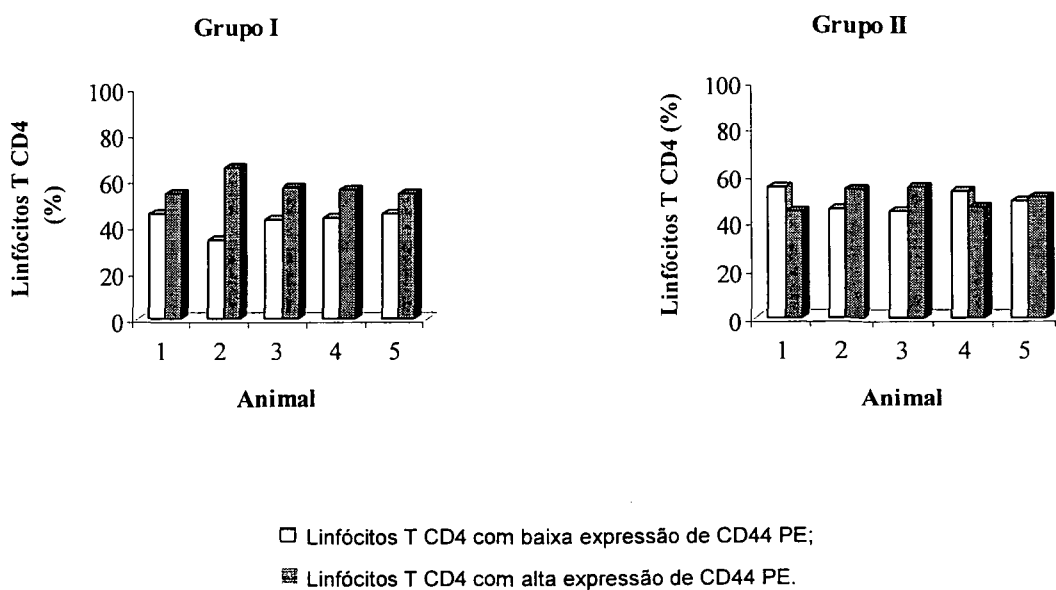
A análise estatística demonstrou igualdade no número de linfócitos T CD4 GAR-FITC negativos nos 2 grupos ($p=0,2220$). O número de linfócitos T CD4 expressando GAR-FITC não foi considerado significativo na análise por citometria de fluxo.

4.7 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO CELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4

Estes resultados referem-se a animais não-submetidos a enxerto. Os resultados da citometria de fluxo para avaliação da expressão de marcadores de ativação dos linfócitos T CD4 (CD25, CD44 e CD69) nos animais não-submetidos a enxerto estão nos gráficos 18, 19 e 20 respectivamente. Os resultados do número total de esplenócitos e linfócitos avaliados em cada grupo estão no anexo 7 e as porcentagens nos anexos 24 a 26.

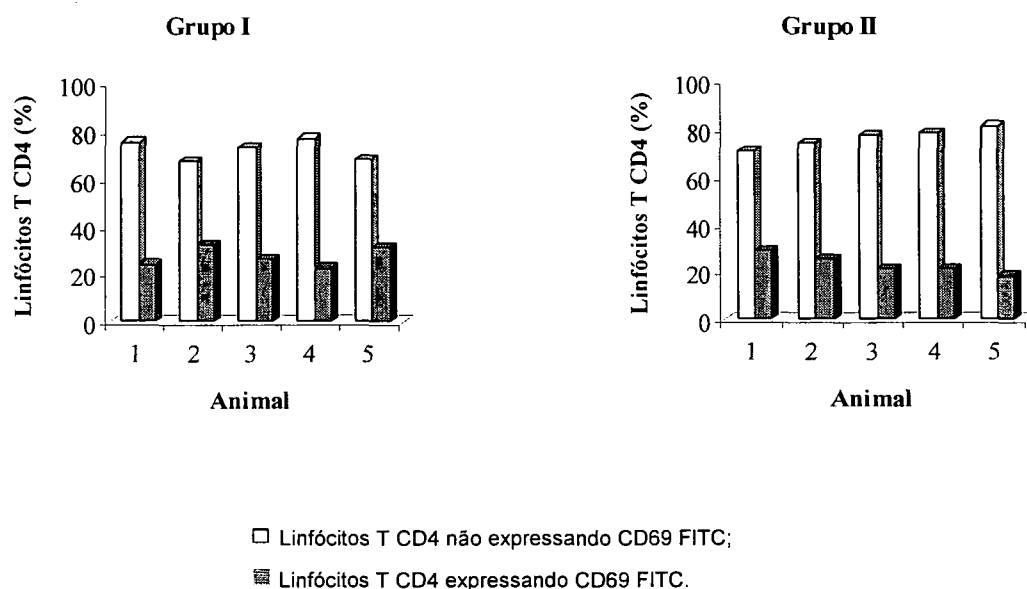
GRÁFICO 18 – EXPRESSÃO DE CD25 FITC - GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)

A análise estatística demonstrou igualdade na expressão de linfócitos T CD4 CD25 negativos nos 2 grupos ($p=0,4200$).

GRÁFICO 19 – EXPRESSÃO DE CD44 - GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)

A análise estatística demonstrou diferença significativa quanto ao número maior de linfócitos T CD4 com alta expressão de CD44 no grupo I em relação ao grupo II ($p=0,0320$).

GRÁFICO 20 – EXPRESSÃO DE CD69 FITC - GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)



A análise estatística demonstrou igualdade na expressão de linfócitos T CD4 CD69 negativos nos 2 grupos ($p=0,1500$).

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.8.1 ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Os enxertos dos 3 animais do grupo II (controle), dos 3 animais do grupo III (anti-CD45RB), dos 3 animais do grupo IV (anti-CTLA4) e dos 3 animais do grupo V (anti-CD45RB + anti-CTLA4), avaliados no 7º dia de pós-operatório, apresentaram na avaliação histológica por hematoxilina e eosina um infiltrado monomorfonuclear ao redor das ilhotas de Langerhans no espaço subcapsular do rim, sem destruir sua arquitetura. Não houve infiltrado no interior das ilhotas ou no parênquima renal. As figuras 14A e 14B representam o 1º animal avaliado nos grupos II e III, respectivamente.

4.8.2 ANIMAIS QUE APRESENTARAM REJEIÇÃO

A análise histológica por hematoxilina e eosina dos rins com os enxertos de todos os animais dos grupos II, IV e V e de 7 animais do grupo III que apresentaram rejeição demonstrou um infiltrado inflamatório monomorfonuclear invadindo o interior das ilhotas de Langerhans, destruindo completamente sua arquitetura em todos os animais. O parênquima renal não apresentou infiltrado inflamatório. A figura 15 mostra corte do rim de um animal do grupo II (controle) que apresentou rejeição no 10º dia de pós-operatório.

4.8.3 ANIMAIS AVALIADOS NO 120º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

A análise histológica por hematoxilina e eosina dos rins com os enxertos dos 10 animais do grupo I (isoenxertos) e dos 7 animais do grupo III (anti-CD45RB) no 120º dia de pós-operatório demonstrou um infiltrado monomorfonuclear no espaço subcapsular renal ao redor das ilhotas de Langerhans sem invasão do seu interior e sem prejuízo de sua arquitetura. O parênquima renal não apresentou infiltrado algum. Os enxertos apresentaram ainda presença de discreta quantidade de fibroblastos ao redor das ilhotas.

A análise por imuno-histoquímica para insulina foi positiva na topografia das ilhotas no espaço subcapsular em todos os animais, em contraste com o parênquima renal, onde foi negativa.

As figuras 16A e 16D representam o 1º animal avaliado no grupo I (isoenxerto) e a figura 16B e 16E o primeiro animal avaliado no grupo III.

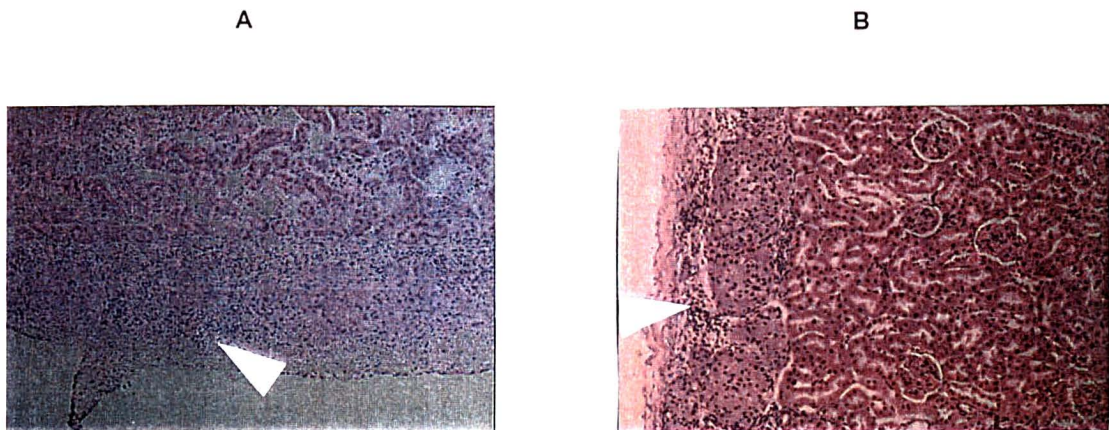
4.8.4 ANIMAIS AVALIADOS APÓS O 2º TRANSPLANTE (GRUPO III)

A análise histológica por hematoxilina e eosina de 3 dos 4 animais do grupo III (anti-CD45RB) submetidos ao segundo transplante com ilhotas provenientes de camundongos BALB/c avaliados no 50º dia de pós-operatório apresentou um infiltrado monomorfonuclear no espaço subcapsular renal ao redor das ilhotas de Langerhans, sem

invasão do seu interior e sem prejuízo de sua arquitetura. O parênquima renal não apresentou infiltrado algum. A análise por imuno-histoquímica para insulina foi positiva na topografia das ilhotas no espaço subcapsular em todos os animais, em contraste com o parênquima renal, onde foi negativa. As figuras 16C e 16F representam o 1º animal avaliado no grupo III (anti-CD45RB).

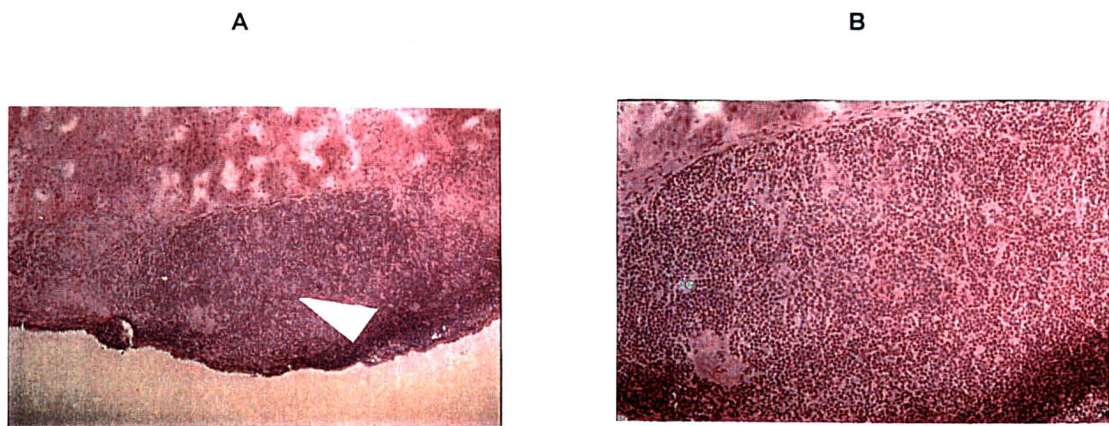
A análise dos enxertos por hematoxilina e eosina nos 3 animais submetidos ao 2º transplante com ilhotas de camundongos CBA e no animal restante que recebeu ilhotas de camundongos BALB/c, todos apresentando rejeição, demonstrou um infiltrado inflamatório monomorfonuclear invadindo o interior das ilhotas de Langerhans e destruindo completamente sua arquitetura.

**FIGURA 14 – ANÁLISE HISTOLÓGICA NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO
GRUPO II (CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)**



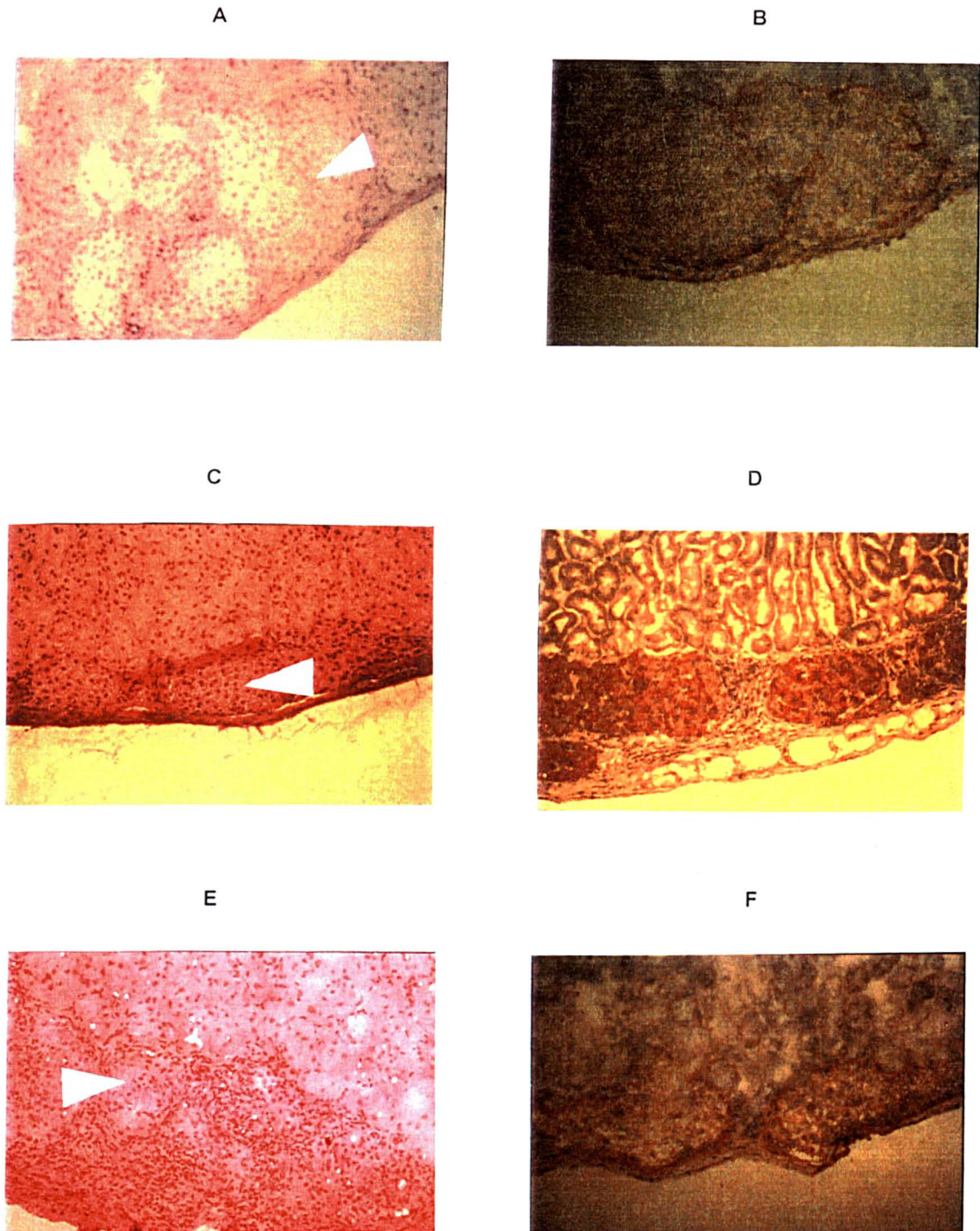
A – grupo II (controle) aumento de 20x. Infiltrado monomorfonuclear localizado ao redor das ilhotas de Langerhans (seta) sem invadir o seu interior. No parênquima renal adjacente não há infiltrado inflamatório. B – grupo III (anti-CD45RB) aumento de 20x. Infiltrado monomorfonuclear localizado ao redor das ilhotas de Langerhans (seta) sem invadir o seu interior. No parênquima renal adjacente não há infiltrado inflamatório.

FIGURA 15 – ANÁLISE HISTOLÓGICA REJEIÇÃO - GRUPO II (CONTROLE)



A – aumento de 20x. Infiltrado monomorfonuclear no espaço subcapsular renal invadindo o interior das ilhotas de Langerhans destruindo sua arquitetura (seta). B – aumento de 40x.

FIGURA 16 - ANÁLISE HISTOLÓGICA NO 120° PÓS-OPERATÓRIO (GRUPOS I E III) E 2° TRANSPLANTE (GRUPO III)



A – grupo I (isoenxerto) aumento de 40x, 120° pós-operatório, hematoxilina eosina. B – grupo I (isoenxerto), aumento de 40x, 120° pós-operatório, imuno-histoquímica para insulina. C – grupo III (anti-CD45RB), aumento de 40x, 120° dia de pós-operatório, hematoxilina e eosina. D – grupo III (anti-CD45RB), aumento de 40x, 120° pós-operatório, imuno-histoquímica para insulina. E – grupo III (anti-CD45RB), aumento de 40x, 2° transplante (50° pós-operatório), hematoxilina e eosina. F - grupo III (anti-CD45RB), aumento de 40x, 2° transplante (50° pós-operatório), imuno-histoquímica para insulina. Em A, C e E observa-se preservação da arquitetura das ilhotas de Langerhans (seta), com discreto infiltrado monomorfonuclear ao seu redor. Em B, D e F observa-se positividade para a presença de insulina (coloração marrom nas ilhotas de Langerhans).

5 DISCUSSÃO

5.1 ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

O hibridoma MB23G2, usado para obtenção do anticorpo monoclonal anti-CD45RB, resulta da fusão de uma célula de mieloma da classe NS-1 com um esplenócito de rato Lewis imunizado com antiimunoglobulina de linfoblastos ativados de camundongo. Essas células, quando mantidas em meio de cultura, produzem grande quantidade de anticorpos monoclonais de rato da classe IgG2A específicos para aminoácidos transcritos a partir do segmento cromossômico 5 (B) da porção citoplasmática da molécula de CD45. A troca freqüente de frascos com adição de solução nutriente permitiu a proliferação celular com conseqüente aumento do volume de anticorpos produzidos. Após a obtenção do volume desejado, avaliou-se a viabilidade celular, considerando que a quantidade máxima de anticorpos é obtida quando aproximadamente 90% das células do hibridoma estão inviáveis.

Os anticorpos foram purificados da solução nutriente com uma coluna de proteína G que apresenta sítios específicos para imunoglobulina G, como o anticorpo anti-CD45RB. Para a extração do anticorpo da coluna de proteína G usou-se uma solução com pH ácido, que tornou instável o anticorpo, o qual foi imediatamente recolhido em um frasco com pH básico.

Após a avaliação da concentração com o espectrofotômetro, a solução contendo o anticorpo monoclonal anti-CD45RB foi submetida a diálise com uma membrana semipermeável. A finalidade dessa diálise foi trocar o solvente em que o anticorpo estava diluído, pela solução salina tamponada com fosfato a 1%, que é inerte para utilização via endovenosa em animais.

Com o objetivo de administrar aos camundongos doses corretas e controladas do anticorpo monoclonal anti-CD45RB, a sua concentração na solução de PBS 1% foi avaliada no espectrofotômetro usando-se como parâmetro de comparação uma IgG padrão de concentração conhecida.

A especificidade a leucócitos murinos do anticorpo obtido foi avaliada por imunofluorescência indireta. Mesmo em baixas concentrações, a avaliação por citometria de fluxo demonstrou anticorpos ligados à membrana dos linfócitos, o que indica que o anticorpo é altamente específico a leucócitos murinos.

5.2 REVERSÃO DA HIPERGLICEMIA

Neste estudo todos os animais diabéticos por estreptozocina apresentaram normalização dos níveis glicêmicos a partir do 5º dia de pós-operatório. Logo, o transplante de ilhotas de Langerhans é um método efetivo para o controle da diabetes. Foram necessárias 400 ilhotas transplantadas para conseguir a massa de células β suficiente para essa normalização.

Diversos estudos na literatura também demonstram que, se um número adequado de ilhotas for transplantado, as anormalidades metabólicas em ratos e camundongos diabéticos são revertidas. Os níveis de glicose plasmática retornam ao normal (KEMP et al., 1973; GRAY e WATKINS, 1974; ZIEGLER et al., 1974; AMAMOO et al., 1975; LORENZ et al., 1975; MARQUET e HEYSTEK, 1975; SLIJEPCEVIC et al., 1975; FINCH e MORRIS, 1976; PIPELEERS-MARICHAL et al., 1976; RABINOVITCH et al., 1976; FELDMAN et al., 1977; NASH et al., 1977; NELKEN et al., 1977; RUMPF et al., 1977; SILBERBERG et al., 1977; HENRIKSSON, 1978; SELAWRY et al., 1978; VESELY et al., 1979; TRIMBLE et al., 1980a); os níveis de insulina circulatória tornam-se normais ou elevados (GRAY e WATKINS, 1974; ZIEGLER et al., 1974; LORENZ et al., 1975; FELDMAN et al., 1977; VIALETES et al., 1979a; TRIMBLE et al., 1980a); a curva do teste de tolerância à glicose é melhorada (MARQUET e HEYSTEK, 1975; VIALETES et al., 1979a; TRIMBLE et al., 1980a; TRIMBLE et al., 1980b) ou normalizada (GRAY e WATKINS, 1974; LORENZ et al., 1975; FELDMAN et al., 1977; TRIMBLE et al., 1980b); a glicosúria é abolida (KEMP et al., 1973; ZIEGLER et al., 1974; RABINOVITCH et al., 1976; HENRIKSSON, 1978;

TRIMBLE et al., 1980b); ocorre aumento de peso nos animais (KONCS et al., 1976; FELDMAN et al., 1977; TRIMBLE et al., 1980a); poliúria, polidipsia e polifagia são eliminadas (ZIEGLER et al., 1974; AMAMOO et al., 1975; PIPELEERS-MARICHAL et al., 1976; FELDMAN et al., 1977; TRIMBLE et al., 1980b); outras anormalidades metabólicas desaparecem, como: níveis séricos elevados de glucagon (PIPELEERS-MARICHAL et al., 1976), níveis séricos elevados de lipídios plasmáticos (ZIEGLER et al., 1974; VIALETES et al., 1979b), níveis diminuídos da enzima hepática guanilatociclase (VESELY et al., 1979). Discretas perturbações detectadas no teste de tolerância à glicose podem ser atribuídas à localização ectópica das ilhotas, à falta de inervação, à massa celular diminuída e à ruptura do circuito enteroinsulínico (TRIMBLE et al., 1980b).

O método de obtenção das ilhotas através da digestão do tecido pancreático com a enzima collagenase e de purificação através de seu gradiente de densidade com a solução de Ficoll® apresenta imperfeições, como ficou demonstrado pela necessidade de cinco doadores para obtenção do número adequado de ilhotas de Langerhans. Esse é um problema comum nos estudos experimentais com transplante de ilhotas de Langerhans (SHIZURU et al., 1987; LENSCHOW et al., 1995; PARKER et al., 1995; ROSSINI et al., 1996; AUERSVALD et al., 1997; KOJA et al., 1997; ZHENG et al., 1997; BASADONNA et al., 1998; RASTELLINI et al., 1999a; ZHENG et al., 1999), bem como nos protocolos clínicos em que um método semelhante para purificação é utilizado (LAKEY et al., 1997).

5.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA DOS ENXERTOS

5.3.1 ISOENXERTOS

Os isoenxertos realizados entre camundongos BALB/c apresentaram sobrevida de 120 dias, sem a utilização de moduladores ou supressores do sistema imune. A igualdade do MHC entre doadores e receptores não desencadeou nenhum estímulo para

a ativação e proliferação linfocitária. Assim sendo, não houve resposta linfocitária específica ao enxerto que culminasse com o processo de rejeição e hiperglicemia.

A ocorrência de hiperglicemia após a nefrectomia esquerda no 120º dia de pós-operatório indica que o estado de euglicemia obtido até então era mantido pelos enxertos. É importante destacar que a administração de estreptozocina pode causar um estado de hiperglicemia transitório, mas reversível, uma vez que as células β nas ilhotas de Langerhans podem recuperar pouco depois sua função. A ação da estreptozocina é dose-dependente: pode ter efeito tóxico direto sobre as células β nas ilhotas de Langerhans ou desencadear resposta imune específica contra as ilhotas. Sua ação tóxica direta sobre as ilhotas ocorre de maneira intensa, provocando hiperglicemia irreversível. No segundo caso, como nem todas as ilhotas são acometidas e algumas são acometidas parcialmente, a resposta imune pode diminuir com o tempo, remanescendo uma massa celular capaz de restaurar os níveis glicêmicos. Caso isso ocorresse com a dose de estreptozocina usada nesse experimento, os animais permaneceriam com níveis glicêmicos normais após a extração do rim esquerdo, que continha o enxerto de ilhotas. Logo, a dose utilizada tem ação tóxica direta sobre as ilhotas de Langerhans.

Os resultados dos isoenxertos demonstram a possibilidade técnica da realização do transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos diabéticos pela ação da estreptozocina com manutenção da euglicemia por período prolongado de tempo.

5.3.2 ALOENXERTOS SEM TRATAMENTO (GRUPO CONTROLE)

Todos os aloenxertos sem tratamento realizados entre as linhagens de camundongos BALB/c (doadores) e C57BL6 (receptores) apresentaram quadro de intensa rejeição entre o 10º e o 15º dia de pós-operatório. Essa reação intensa na ausência de modulação ou supressão do sistema imune demonstra a imunogenicidade da ilhotas de Langerhans dos camundongos BALB/c nos receptores. Logo, pode-se considerar esse modelo de transplante adequado para a avaliação de uma intervenção a ser realizada no sistema imune com o objetivo de modular sua ação.

5.3.3 ALOENXERTOS TRATADOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB

5.3.3.1 Primeiro transplante

Os animais submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 apresentaram maior sobrevida do enxerto em relação ao grupo controle, resultado esse estatisticamente significativo, pois 50% dos animais chegaram ao 120º dia de pós-operatório. Esse aumento da sobrevida dos enxertos foi obtido às custas de somente 3 doses do anticorpo administradas 1 dia antes do procedimento, no pré-operatório imediato e no 5º dia de pós-operatório. Esse fato indica que a alteração induzida pela medicação produz efeitos em longo prazo e possivelmente não está relacionada à supressão do sistema imune. BASADONNA et al. (1998) demonstraram que a administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB produz uma diminuição transitória no número de linfócitos T CD4 no sangue periférico de camundongos submetidos ao transplante de ilhotas de Langerhans; esse número retorna ao normal ao redor do 14º dia de pós-operatório. Os autores observaram ainda que o número de linfócitos T CD4 no baço e no tecido linfóide não se modificou com a administração do anticorpo. Esses achados reforçam mais ainda a hipótese de que o mecanismo de ação do anticorpo não é por imunossupressão.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes em termos de sobrevida do enxerto utilizando também o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 (AUERSWALD et al., 1997; BASADONNA et al., 1998).

Esses dados mostram que a intervenção no sinal 1 do processo de ativação linfocitária por aloantígenos com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB causa aumento na sobrevida dos enxertos.

5.3.3.2 Segundo transplante

Sete animais permaneceram euglicêmicos até o 120º de pós-operatório; após nefrectomia esquerda, englobando o enxerto, apresentaram hiperglicemia com valores superiores a 200 mg/dl. Três dos 4 animais desse grupo submetidos a 2º transplante com

ilhotas provenientes de camundongos BALB/c apresentaram novamente níveis glicêmicos normais até o 50º dia de pós-operatório, o que indica que o anticorpo monoclonal anti-CD45RB induz tolerância imunológica às ilhotas de Langerhans de camundongos BALB/c. Os 3 animais restantes submetidos a um 2º transplante com ilhotas provenientes de camundongos CBA/H apresentaram rejeição em seguida. Essa linhagem de camundongos apresenta diferenças antigênicas importantes em relação aos camundongos BALB/c, originalmente utilizados como doadores. BASADONNA et al. (1998) obtiveram os mesmos resultados também com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 em um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans em camundongos.

Fica assim demonstrado que a modulação no sistema imune causada pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB é específica aos antígenos apresentados no momento de sua administração, dados esses compatíveis com a indução de tolerância imunológica.

A tolerância imunológica é obtida por três mecanismos básicos – deleção clonal, anergia e supressão específica (NAJI, 1996) –, os quais não se excluem; de fato coexistem em muitos modelos de tolerância imunológica.

Deleção clonal é o mecanismo fisiológico do timo e da medula óssea para indução de tolerância imunológica às células próprias do organismo. Linfócitos com afinidade aos antígenos do MHC (sinal 1) do próprio organismo apresentados por APCs no timo tornam-se anérgicos e na medula óssea sofrem apoptose (NOSSAL, 1994; SURH e SPRENT, 1994). As APCs do timo e da medula óssea não fornecem o sinal 2 para esses linfócitos específicos. Esse é o mesmo mecanismo dos modelos de indução de tolerância imunológica que se utilizam da inoculação intratímica de antígenos.

Supressão é um mecanismo de indução de tolerância imunológica em linfócitos maduros. Essa forma de tolerância é observada nos diversos modelos em que linfócitos T de animais que adquiriram tolerância imunológica a determinado enxerto através de intervenção qualquer são transfundidos para outros animais que também se tornam tolerantes após receberem enxerto idêntico àquele dos doadores de linfócitos (HALL et al., 1990).

Anergia é outro mecanismo de indução de tolerância imunológica em linfócitos maduros (BURKLY et al., 1989; FOWLKES e RAMSDELL, 1993). Esse efeito resulta da interação de linfócitos T com um antígeno específico na ausência do segundo sinal necessário para ativação linfocitária. Esse é o mecanismo observado nos modelos de indução de tolerância com manipulação da interação das APCs com os linfócitos T. O uso de anticorpos monoclonais anti-CD45RB enquadra-se nesse caso. LAZAROVITS et al. (1996) demonstraram *in vivo* que o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 causou aumento da fosforilação da fosfolipase C γ 1, uma propriedade de células anérgicas.

5.3.4 ALOENXERTOS TRATADOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CTLA4

Os animais submetidos a transplante tratados com o anticorpo monoclonal anti-CTLA4 apresentaram sobrevida do enxerto igual à dos animais do grupo controle. O bloqueio do receptor CTLA4 não causa nenhuma alteração no sistema imune. A ausência dos sinais negativos para a proliferação linfocitária fornecida pelo receptor CTLA4 poderia, sim, facilitar o processo de rejeição. No entanto o que ocorre é a progressão natural do processo de reconhecimento antigênico e o desencadeamento da resposta linfocitária específica, culminando com a rejeição do enxerto em 100% dos casos.

5.3.5 ALOENXERTOS TRATADOS COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD45RB E ANTI-CTLA4

O sinal 2 de ativação linfocitária consiste na interação de moléculas chamadas coestimulatórias: primeiro ocorre interação da molécula CD40 nas APCs com a molécula CD40L nos linfócitos T (NOELLE et al., 1992); depois, das moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) nas APCs, identificadas pela primeira vez por LINSLEY et al. (1990), com a molécula CD28, identificada por HANSEN et al. (1980), e CTLA4, identificada por BRUNET et al. (1987), nos linfócitos T CD4; por último, a interação da molécula ICAM-1 nas APCs com a molécula LFA-1 nos linfócitos T (ISOBE et al., 1992). A interação CD40/CD40L é a que ocorre mais precocemente nesse processo aumentando a expressão de B7-1, B7-2 e ICAM-1 nas APCs (HOLLANDER et al., 1999).

A interação de B7-1 e B7-2 com CD28 induz os linfócitos T CD4 a produzir interleucina 2 (LINSLEY et al., 1991a; GIMMI et al., 1991) e a iniciar seu processo de diferenciação (SEDER et al., 1994; KING et al., 1995). A molécula CTLA4 é estruturalmente homóloga à CD28 e compartilha a habilidade de ligar-se com as moléculas B7-1 e B7-2 (LINSLEY et al., 1991b; LENSCHOW et al., 1993; MERWE et al., 1997). Sua expressão é aumentada após a ativação dos linfócitos T, ocorrendo o nível máximo em 48 a 72 horas (LINSLEY et al., 1992; WALUNAS et al., 1994). Estudos *in vitro* (WALUNAS et al., 1994; KRUMMEL e ALLISON, 1995) e *in vivo* (KEARNEY et al., 1995) demonstraram que a molécula CTLA4 é uma reguladora negativa no processo de ativação dos linfócitos T CD4, antagonista aos sinais positivos fornecidos através da estimulação da CD28.

A ativação completa dos linfócitos T requer a estimulação do complexo CD3-TCR e dos receptores coestimulatórios (MUELLER et al., 1989, LINSLEY et al., 1996). Após essa ligação, os receptores CD28 e CTLA4 transmitem importantes sinais, necessários para a ativação dos linfócitos T (SCHWARTZ et al., 1992; LINSLEY e LEDBETTER, 1993; GUINAN et al., 1994; JUNE et al., 1994; ALLISON, 1994; LINSLEY et al., 1996). O receptor CD28 tem baixa afinidade pelas moléculas B7 (LINSLEY et al., 1994; LINSLEY et al., 1996) e é expresso em linfócitos T ativados e inativados. Em contraste, o receptor CTLA4 tem alta afinidade com as moléculas B7 (LINSLEY et al., 1991a; LINSLEY et al., 1994; LINSLEY et al., 1996; MERWE et al., 1997) e é expresso somente após a ativação dos linfócitos T (BRUNET et al., 1987; LINSLEY et al., 1996). As moléculas CD28 e CTLA4 têm funções distintas durante o processo de ativação linfocitária. O estímulo via CD28 aumenta a produção de citocinas e incrementa a ativação celular (SCHWARTZ et al., 1992; LINSLEY e LEDBETTER, 1993; GUINAN et al., 1994; JUNE et al., 1994; ALLISON, 1994). O estímulo do receptor CTLA4 com anticorpos monoclonais específicos não produz os mesmos efeitos mediados pelo receptor CD28 (LINSLEY et al., 1992; DAMIE et al., 1994; WALUNAS et al., 1994; KRUMMEL e ALLISON, 1995; LINSLEY et al., 1996); pelo contrário, causa sua diminuição (KRUMMEL e ALLISON, 1995). Camundongos transgênicos que

não expressam a molécula CTLA4 apresentam uma doença linfoproliferativa fatal que se manifesta pelo incremento do número de linfócitos T ativados e por um processo auto-imune de destruição tecidual (TIVOL et al., 1995; WATERHOUSE et al., 1995). Assim sendo, a estimulação do receptor CTLA4 é um importante regulador negativo da ativação dos linfócitos T.

Cem por cento dos animais submetidos ao transplante que foram tratados com a combinação dos anticorpos monoclonais anti-CD45RB e anti-CTLA4 apresentaram rejeição entre o 15º e o 25º dia de pós-operatório. Isso demonstra que o aumento da sobrevida dos enxertos induzida pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB é dependente dos estímulos negativos fornecidos pelo receptor CTLA-4. O anticorpo monoclonal anti-CTLA4 causa somente um bloqueio mecânico do receptor CTLA4 nos linfócitos T. Com isso as moléculas B7-1 e B7-2 nas células apresentadoras de antígenos ligam-se somente ao receptor CD28 nos linfócitos T.

A grande maioria dos protocolos para modulação do sistema imune e indução de tolerância imunológica atuam sobre o sinal coestimulatório (sinal 2) do processo de ativação linfocitária (PANKEWYCZ et al., 1989; HAO et al., 1992; LENSCHOW et al., 1995; STEURER et al., 1995; GAINER et al., 1997; TRAN et al., 1997; ZHENG, et al., 1999). Esses protocolos bloqueiam as moléculas B7-1 e B7-2 nas APCs (anticorpos monoclonais anti-B7-1 e anti-B7-2 e imunoglobulina CTLA4) e o receptor CD40L (anticorpo monoclonal anti-CD40L) e LFA1 (anticorpo monoclonal anti-LFA1) nos linfócitos T. O anticorpo monoclonal anti-CD45RB produz uma intervenção no sinal 1, apresentando resultados semelhantes.

5.4 EXPRESSÃO DE CD45

A estrutura da proteína CD45 consiste em um segmento extracelular variável (formado por 400 a 500 aminoácidos) com características de receptor, um segmento transmembranoso e um segmento intracelular (formado por cerca de 700 aminoácidos)

com duas regiões de atividade enzimática (SARMIENTO et al., 1982). O gene responsável pela transcrição da proteína está mapeado no cromossomo 1 e é composto por 34 segmentos. Diferentes formas de CD45 podem ser geradas pela ação alternada do RNAm nos segmentos variáveis 4, 5 e 6 (inicialmente conhecidos por segmentos A, B e C), dando origem a diferentes seqüências de aminoácidos localizadas na extremidade distal do segmento extracelular.

A porção extracelular da estrutura da proteína CD45 pode ser reconhecida por anticorpos específicos. TROWBRIDGE (1978) foi o primeiro a purificar anticorpos contra a proteína de membrana CD45 em camundongos, na época conhecida como T200 ou LCA. Para a produção dos anticorpos foi utilizado um hibridoma conjugando esplenócitos de ratos e células de mieloma humano. Inicialmente os anticorpos foram utilizados em técnicas de coloração por imuno-histoquímica, na tentativa de diferenciar neoplasias de origem linfóide e não-linfóide (WARNKE et al., 1983).

Existem dois tipos de anticorpos monoclonais anti-CD45 (McMICHAEL, 1987; STREULI et al., 1988; BASADONNA et al., 1998): o primeiro consiste em um anticorpo denominado pan-anti-CD45, que é capaz de reconhecer um segmento da proteína CD45 comum a todas as possíveis combinações dos segmentos variáveis 4, 5 e 6; o segundo tipo, anticorpo monoclonal anti-CD45RB, reconhece uma porção restrita (R) da proteína formada por aminoácidos transcritos a partir do segmento cromossômico 5 (B).

O anticorpo monoclonal anti-CD45RB pode ser utilizado para dividir os linfócitos T CD4 em duas populações: linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de alto peso molecular e linfócitos T CD4 que expressam CD45RB de baixo peso molecular. As formas de CD45 identificadas em camundongos pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB apresentam aminoácidos transcritos dos segmentos 4+5, 5+6 e 5 isoladamente (BASADONNA et al., 1998). Essas combinações apresentam diferentes pesos moleculares: 220.000 quilodáltons para a forma transcrita dos segmentos 4+5; 200.000 quilodáltons para a forma transcrita dos segmentos 5+6; 190.000 quilodáltons para a forma transcrita do segmento 5 isoladamente (SUNDERLAND et al., 1979;

MICHAELSON et al., 1979; STANDRING et al., 1978; COFFMAN e WEISSMAN, 1981; TERRY et al., 1988). Uma quarta forma não reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB apresenta peso molecular de 180.000 quilodáltons e não é transcrita a partir de nenhum dos três segmentos variáveis (SUNDERLAND et al., 1979; MICHAELSON et al., 1979; STANDRING et al., 1978; COFFMAN e WEISSMAN, 1981; TERRY et al., 1988). Os linfócitos T CD4 com CD45RB de alto peso molecular expressam em sua membrana uma grande quantidade de moléculas de CD45 formadas por aminoácidos transcritos a partir dos segmentos 4+5, 5+6 ou 5 isoladamente. Os linfócitos T CD4 com CD45RB de baixo peso molecular expressam em sua membrana pouca quantidade de moléculas de CD45 formadas por aminoácidos transcritos a partir do segmento 5 isoladamente e grande quantidade de moléculas formadas por aminoácidos transcritos a partir dos segmentos cromossômicos que não os variáveis, não-reconhecidas pelo anticorpo monoclonal anti-CD45RB (BASADONNA et al., 1998).

A expressão das diferentes formas de CD45 é específica para diferentes linhagens e estado de ativação de células hematopoéticas. No entanto linfócitos individuais expressam simultaneamente mais de uma forma, nos diferentes tipos de linfócitos, de acordo com suas funções distintas e estado de ativação (KORETZKY et al., 1990; KORETSKY et al., 1991). A expressão de CD45 é dinâmica: os linfócitos T alteram a expressão de maneira altamente regulada durante a seleção tímica e durante a exposição a antígenos na periferia (ODONERA et al., 1996).

Os animais do grupo controle (submetidos ou não a enxerto), não-tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB, apresentaram duas populações de linfócitos T CD4 na avaliação por citometria de fluxo: na primeira, linfócitos T CD4 com alta expressão de CD45RB; na segunda, linfócitos T CD4 com baixa expressão de CD45RB. Essas duas populações de linfócitos apresentaram-se em proporção constante em todos os animais desses grupos: aproximadamente 50% dos linfócitos T CD4 apresentaram CD45RB de alto peso molecular e outros 50% apresentaram CD45RB de baixo peso molecular.

Esses mesmos achados foram observados nos animais submetidos a enxerto e tratados com o anticorpo anti-CTLA4, visto que esse anticorpo somente bloqueia o receptor, não alterando a expressão das proteínas da membrana celular.

Os animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB (submetidos ou não a enxerto) também apresentaram essas duas populações distintas de linfócitos T CD4, mas com proporção modificada: o tratamento causou mudança na expressão de CD45RB, aumentando significativamente a quantidade de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de baixo peso molecular e diminuindo a quantidade de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto peso molecular. Essa alteração na expressão de CD45RB está associada a significativo aumento na sobrevida dos enxertos e também na indução de tolerância imunológica.

GAO et al. (1999) demonstraram que os linfócitos T CD4 de animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB são os responsáveis pela modulação do sistema imune e conseqüente aumento da sobrevida dos enxertos e indução de tolerância imunológica. Em um modelo de transplante renal em camundongos, os autores conseguiram induzir tolerância imunológica em animais não-submetidos a tratamento com o anticorpo anti-CD45RB, porém submetidos a uma transfusão de linfócitos T CD4 de animais com tolerância imunológica devida ao uso do anticorpo.

A associação entre a mudança na expressão de CD45RB e a sobrevida dos enxertos foi comprovada por BASADONNA et al. (1998). Os autores utilizaram dois tipos de anticorpos monoclonais anti-CD45RB – MB23G2 e MB4B4 – em um modelo de transplante de ilhotas de Langerhans. O primeiro foi associado a um aumento na sobrevida dos aloenxertos, o que não ocorreu com o segundo. A análise do produto da lise de linfócitos pelo método de Western Blot demonstrou que o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 causou uma mudança na expressão de CD45, com aumento do número de linfócitos expressando as formas de baixo peso molecular; os linfócitos dos animais tratados com o anticorpo MB4B4 apresentaram-se da mesma maneira que os animais controle.

Esses mesmos achados foram observados por LAZAROVITS et al. (1996) em um estudo com transplante renal em camundongos. Os enxertos dos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 apresentaram significativo aumento da sobrevida em relação aos do grupo controle, o que não aconteceu com os animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB4B4.

Segundo diversos autores, a subdivisão em duas populações de linfócitos T CD4 de acordo com a expressão de CD45 pode corresponder a linfócitos Th1 e Th2 (LEE et al. 1990, POWRIE et al. 1993; POWRIE et al. 1994; BASADONNA et al. 1998). Estudos funcionais dos linfócitos T CD4 demonstram que somente alguns clones são capazes de ativar linfócitos B, iniciando a produção de anticorpos da classe IgG1 e IgE; esses linfócitos T CD4 foram denominados Th2 (KIM et al., 1985). Outros clones de linfócitos T CD4 são capazes somente de realizar algumas funções distintas, como reação de hipersensitividade tardia, ativação de macrófagos, citotoxicidade celular e supressão da resposta mediada por anticorpos. Os linfócitos T CD4 com atividade citotóxica contra células expressando moléculas transcritas do MHC que apresentam antígenos específicos foram denominados Th1 (TITE et al., 1987; BOTTOMLY et al., 1989). Essa dicotomização da população de linfócitos CD4 em Th1 e Th2 foi também demonstrada com base na produção de linfocinas (MOSMANN e COFFMAN, 1987; MOSMANN e COFFMAN, 1989): a primeira subpopulação (Th1) produz principalmente interferon gama e interleucina 2; a segunda (Th2) produz principalmente interleucina 4 e 10.

BOTTOMLY et al. (1989) mostraram que em camundongos a divisão dos linfócitos T CD4 em duas populações com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB é acompanhada de uma heterogeneidade funcional que pode significar estágios de diferenciação ou especialização dos linfócitos T CD4. Os linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto peso molecular produziram altas quantidades de interleucina 2 e interferon- γ e baixas quantidades de interleucina 4 e 10, em resposta a uma variedade de estímulos mitogênicos; os linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de baixo peso molecular produziram interleucina 4 e 10 e pouca quantidade de

interleucina 2 e interferon- γ . Os autores afirmam que nos camundongos as subpopulações de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto e de baixo peso molecular equivalem, na realidade, às duas subpopulações de linfócitos CD4: linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) e linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1). Esses achados foram corroborados por POWRIE et al. (1993), POWRIE et al. (1994); BASADONNA et al. (1998).

A mudança da expressão de CD45RB com aumento das formas de baixo peso molecular também foi observada em outro estudo em que se usou o anticorpo monoclonal anti-CD45RB (BASADONNA et al., 1998). Nesse estudo a quantificação com PCR do RNA mensageiro para produção de interleucinas por linfócitos T CD4 nos enxertos dos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB demonstrou altas quantidades de RNA mensageiro para interleucina 4 e interleucina 10, características de linfócitos Th2, em comparação com os animais não-tratados; a quantidade do RNA mensageiro para interleucina 2 e interferon- γ não se alterou nos dois grupos. Resultados semelhantes foram observados por GAO et al. (1999) num modelo de transplante renal em camundongos tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Houve um incremento na sobrevida dos enxertos e indução de tolerância imunológica; a análise dos enxertos demonstrou diminuição de genes para interferon- γ e fator de necrose tumoral, e citocinas compatíveis com resposta mediada por linfócitos Th1. LAZAROVITS et al. (1996) analisaram a quantidade de RNA mensageiro em aloenxertos renais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB MB23G2 após a obtenção de aumento significativo da sobrevida. Houve redução de RNAm para interferon- γ , fator de necrose tumoral- α e molécula de adesão intercelular em relação aos controles. Esses achados reforçam mais ainda a hipótese de que os linfócitos T CD4 com alta expressão de CD45RB correspondem aos linfócitos Th1 e os com baixa expressão aos Th2.

Os linfócitos Th2 apresentam características reguladoras negativas dos linfócitos Th1 e características reguladoras da resposta mediada por anticorpos (KILLAR et al., 1987; BOOM et al., 1988; SWAIN et al., 1990; SADICK et al., 1990; FIORENTINO et al., 1991; DALLMAN et al., 1991; TAKEGUCHI et al., 1992;

MINTY et al., 1993; O'CONNEL et al., 1993; LIPMAN et al., 1994). Os linfócitos Th1 estão relacionados a respostas inflamatórias associadas ao processo de rejeição e auto-imunidade (FOWELL et al., 1991; DALLMAN et al., 1991; TAKEGUCHI et al., 1992; O'CONNEL et al., 1993; FOWELL e MASON, 1993; LIPMAN et al., 1994). Os linfócitos Th1 são produtores preferencialmente de interleucina 2 e interferon- γ : a interleucina 2 estimula a proliferação de linfócitos T e ativa linfócitos T citotóxicos (NICKERSON et al., 1997); o interferon- γ tem ação quimiotática de macrófagos para o enxerto, estimula linfócitos T citotóxicos e aumenta a expressão antigênica no enxerto (NICKERSON et al., 1997). POWRIE et al. (1993) demonstraram que a reconstituição do sistema imune de camundongos SCID com linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular resulta em uma doença inflamatória intestinal severa, não observada em animais reconstituídos com linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular ou ambas as células. Isso demonstra que os linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular são moduladores negativos da reação auto-imune desencadeada pelos linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto peso molecular.

Diversos autores demonstraram que a aplicação de terapias que induzem tolerância imunológica a enxertos modificaram a resposta imune de um padrão predominantemente composto por linfócitos Th1 para Th2 (BUGEON et al., 1992; TAKEUCHI et al., 1992; NICKERSON et al., 1993; QIN et al., 1993; SAYEGH et al., 1995). Muitos autores defendem a hipótese de que a tolerância seja resultado direto de uma resposta ao enxerto conduzida na ausência da expressão de interleucina 2 e de interferon γ e na presença de interleucina 4 e 10 (BUGEON et al., 1992; HANCOCK et al., 1993; KUPIEC-WEGLINSKI et al., 1993; SAYEGH et al., 1995). Estudos *in vitro* demonstraram que a interleucina 10 exerce diversos efeitos inibitórios: na secreção de interferon γ , na proliferação de linfócitos Th1 estimulados por macrófagos, na expressão de antígenos maiores de histocompatibilidade (MHC) em monócitos, na secreção de interleucina 12 por macrófagos e na expressão das moléculas coestimuladoras B7-1 e B7-2 na superfície de macrófagos (WALL et al., 1991; D'ANDREA et al., 1993; DING et

al., 1993; MACATONIA et al., 1993); por consequência, ela é uma potente inibidora da resposta de linfócitos Th1 estimulada por macrófagos. Estudos relacionados à interleucina 4 demonstraram que ela não é essencial para a indução de tolerância. O tratamento com a imunoglobulina CTLA4, bloqueadora dos receptores coestimulatórios B7-1 e B7-2, induz tolerância em camundongos transgênicos cujos linfócitos não secretam interleucina 4 (LAKKIS et al., 1996); os mesmos resultados foram obtidos usando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 (BUSHELL et al., 1996). A importância da detecção de interleucina 4 durante a indução de tolerância imunológica não está na detecção *per se*, mas sim na ausência de expressão de interleucina 2 e interferon- γ (NICKERSON et al., 1997).

5.5 EXPRESSÃO DE CTLA4

Os animais do grupo controle (com ou sem transplante) apresentaram expressão de CTLA4 somente nos linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de baixo peso molecular. O aumento do número de linfócitos T CD4 que expressaram CD45RB de baixo peso molecular induzido pela administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB foi acompanhado por um incremento proporcional do número de linfócitos T CD4 que expressaram CTLA4 no compartimento intracelular. Os linfócitos T com expressão de CD45RB de alto peso molecular não apresentaram expressão de CTLA4 intracelular antes ou após o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB.

Diversos autores também determinaram a expressão de CTLA4 somente no compartimento intracelular de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de baixo peso molecular, mostrando ausência de expressão de CTLA4 de superfície ou intracelular em linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto peso molecular (WALUNAS et al., 1994; LINSLEY et al., 1996; ALEGRE et al., 1996; METZ et al., 1998).

Os animais tratados com ambos os anticorpos anti-CD45RB e anti-CTLA4 também apresentaram aumento do número de linfócitos T CD4 expressando CD45RB

de baixo peso molecular com CTLA4 intracelular e diminuição de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de alto peso molecular. No entanto os animais apresentaram rejeição precocemente. Isso demonstra que o incremento da expressão de CTLA4 nos linfócitos T CD4 é o mecanismo pelo qual a administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB torna os linfócitos T CD4 dos receptores das ilhotas de Langerhans não-reativos a elas, pois o bloqueio do receptor CTLA4 com o anticorpo anti-CTLA4 evita os estímulos negativos à ativação linfocitária fornecidos por essa molécula, predominando os estímulos positivos proporcionados pela molécula CD28. Na ausência desse bloqueio, como nos animais do grupo III tratados somente com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB, predominam os estímulos negativos da molécula CTLA4, devido ao incremento de sua expressão intracelular.

O predomínio de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de baixo peso molecular também é essencial para o aumento de sobrevida e indução de tolerância imunológica observados, visto que somente esse subtipo de linfócito T expressa a molécula CTLA4 no seu compartimento intracelular.

A molécula CTLA4 foi detectada somente no compartimento intracelular. A fluorescência para CTLA4 na superfície dos linfócitos T CD4 foi muito pequena. Ambas as moléculas CD28 e CTLA4 têm características típicas de receptores de membrana (HARPER et al., 1991; BALZANO et al., 1992), mas somente a molécula CD28 se encontra nessa posição (JUNE et al., 1990; JUNE et al., 1994). Diversos autores também determinaram a expressão de CTLA4 no compartimento intracelular (HARPER et al., 1991; LINSLEY et al., 1992; LEUNG et al., 1995; LINSLEY et al., 1996), e, ainda, outros mostraram sua expressão no interior do complexo de Golgi (KORNFELD e KORNFELD, 1985; VELASCO et al., 1993; LEUNG et al., 1995; LINSLEY et al., 1996). Após a interação da APC com o linfócito T CD4, o complexo de Golgi se posiciona voltado para a face da célula em que ocorre o contacto (SINGER, 1992; LEUNG et al., 1995), o que resulta na secreção de proteínas como citocinas (POO et al., 1988; KUPFER et al., 1991; LEUNG et al., 1995) ou grânulos citotóxicos (BERKE et al., 1994) no sítio de contacto intercelular. Como proteínas secretadas e proteínas de

membrana utilizam o mesmo mecanismo de exportação, ocorre também a secreção direcionada da proteína de membrana CTLA4. Por ser instável a sua presença na superfície celular mediando a interação dos linfócitos T com as APCs, ela é reciclada continuamente entre o compartimento intracelular e a superfície linfocitária (ALEGRE et al., 1996; LINSLEY et al., 1996; SHIRATORI et al., 1997).

A presença de CTLA4 no compartimento intracelular e sua ciclagem para a superfície celular possivelmente representa a necessidade de limitar os níveis dessa molécula potente e de alta afinidade às moléculas B7-1 e B7-2 em relação à molécula CD28 (LEUNG et al., 1995; LINSLEY et al., 1996).

Como controle para a fluorescência de CTLA4 intracelular, foi utilizada uma IgG de hamster inespecífica. A fluorescência para IgG de hamster intracelular foi mínima, sendo por isso considerada desprezível. A necessidade do uso desse controle se deve à possibilidade de a fluorescência para CTLA4 intracelular somente ocorrer devido à captação do anticorpo após o fechamento dos poros na membrana celular, obtidos por incubação com a saponina.

5.6 ANTICORPO ANTI-CD45RB RESIDUAL

A avaliação da presença de anticorpo anti-CD45RB MB23G2 residual ligado à membrana dos linfócitos T CD4 realizada com um anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC foi necessária para determinar se a mudança de expressão da molécula CD45 com aumento das formas de baixo peso molecular não ocorreu somente por bloqueio mecânico do receptor. O anticorpo anti-CD45RB MB23G2 é específico ao segmento variável 5 (B) do receptor CD45; caso estivesse ligado ao receptor durante a avaliação dos linfócitos T CD4 por citometria de fluxo, o anticorpo utilizado para a avaliação da expressão de CD45RB (anti-CD45RB C363.16A FITC) poderia não encontrar um sítio específico de ligação, dando falsa impressão de aumento de linfócitos T CD4 com expressão de CD45RB de baixo peso molecular.

A avaliação da presença de anti-CD45RB MB23G2 residual foi negativa, ou seja, no momento da avaliação por citometria de fluxo o anticorpo já não estava presente na membrana dos linfócitos T CD4, não causando portanto interferência alguma na expressão de CD45.

5.7 INCUBAÇÃO CONJUNTA DE ANTI-CD45RB MB23G2 E C363.16A

Essa avaliação teve o mesmo propósito da avaliação da presença de anti-CD45RB MB23G2 residual. Os linfócitos T CD4 foram incubados inicialmente com o anticorpo anti-CD45RB MB23G2 e, em um segundo momento, com o C363.16A FITC. A avaliação da expressão de C363.16A FITC por citometria de fluxo mostrou a presença desse anticorpo em quase 100% dos linfócitos T CD4 avaliados. Isso indica que os aminoácidos do segmento 5 (B) da molécula de CD45 para os quais o anticorpo anti-CD45RB MB23G2 é específico são diferentes dos do anticorpo anti-CD45RB C363.16A FITC, o que demonstra que, mesmo que o anticorpo anti-CD45RB MB23G2 estivesse presente no momento da avaliação dos linfócitos T CD4 por citometria de fluxo, ele não interferiria na expressão de C363.16A FITC, visto que os dois anticorpos são específicos a sítios diferentes do segmento 5 (B) da molécula CD45.

5.8 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4

Os resultados da avaliação dos marcadores de ativação de linfócitos T CD4 não mostraram diferença entre os animais do grupo I (controle) e do grupo II (anti-CD45RB) para a expressão de CD25 e CD69. Quanto à expressão de CD44, os animais do grupo II apresentaram um menor número de linfócitos T CD4 com alta expressão de CD44. A interpretação desses dados demonstra que não houve ativação dos linfócitos T CD4 com a administração do anticorpo monoclonal. Isso indica que não é através da ativação dos linfócitos T CD4 que o anticorpo monoclonal anti-CD45RB induz a mudança da expressão de CD45RB de alto peso molecular para baixo peso molecular

Os linfócitos T CD4 virgens de estímulo apresentam expressão de CD45 de alto peso molecular, baixa expressão de CD44, são negativos para CD25 e CD69 e são células pequenas no estado G0 do ciclo celular, com posição bem definida na avaliação frontal e lateral por citometria de fluxo (MACDONALD et al., 1990; BIERKELAND, 1992; SWAIN et al., 1996; JANEWAY et al., 1999). A ativação linfocitária desencadeia uma mudança na expressão de CD45 e de outros marcadores de membrana. Os linfócitos T CD4 ativados expressam CD45 de baixo peso molecular, alta expressão de CD44, são positivos para CD69 e CD25 e são células blastóides de grande volume (WEINBERG et al., 1990; SWAIN et al., 1991; HORGAN et al., 1992; SWAIN et al., 1994; SWAIN et al., 1996; JANEWAY et al., 1999). Os linfócitos T CD4 de memória expressam grande quantidade de CD45 de baixo peso molecular, baixa expressão de CD44 e são negativos para CD25 e CD69 (HAYNES et al., 1989; BUDD et al., 1987c; SANDERS et al., 1988).

O receptor de membrana CD25 corresponde à cadeia α do receptor para interleucina 2; está presente na membrana de linfócitos T, B e monócitos ativados (CABTREE, 1989; CRISPIN et al., 1998; JANEWAY et al., 1999). A expressão desse receptor é fundamental para a progressão do ciclo celular nos linfócitos T CD4 ativados até a ocorrência de mitose. Os sinais 1 (via TCR) e 2 (sinais coestimulatórios) que determinam a ativação dos linfócitos T CD4 induzem uma progressão do ciclo celular da fase G0 (estado de repouso) para G1 e expressão de CD25 na membrana. A progressão da fase G1 para a fase S no processo de mitose ocorre somente após o estímulo celular, através da ligação das interleucinas 2 ou 4 aos seus respectivos receptores (SMITH, 1996). A expressão do receptor CD25 é aumentada após 12 a 24 horas do estímulo antigênico via TCR, facilitando a proliferação e diferenciação celular (THEZE et al., 1996; REA et al., 1999). Assim sendo, o receptor CD25 é considerado um marcador da fase intermediária de ativação linfocitária (KELLY et al., 1988; REA et al., 1999).

A expressão do receptor de membrana CD44 ocorre em 95% dos leucócitos, na maioria dos eritrócitos, células cerebrais e timócitos no córtex do timo (DAUCHAU et al., 1980; HAYNES et al., 1989). É um receptor com diversas funções, como a de mediar a adesão celular ao ácido hialurônico (ARUFFO et al., 1992; CULTY et al., 1990; MIYAKE et al., 1990; GUNTHER, 1993), ao colágeno e à fibronectina (CARTER e

WAYNER, 1988; JALKANEN et al., 1992; GUNTHER, 1993), às células estromais (HAYNES et al., 1989; SMITH, 1996) e ao endotélio venoso (JALKANEN et al., 1987; GUNTHER, 1993). O processo de adesão intercelular e de adesão a outros elementos é essencial para o funcionamento normal do sistema imune. Existem diversas famílias de moléculas de adesão que proporcionam especificidade para o reconhecimento celular. As mais importantes são as integrinas, superfamília das imunoglobulinas, selectinas e CD44 (SMITH, 1996). A expressão de CD44 (e também de CD69) é aumentada nos linfócitos T após a ocorrência da seleção positiva no timo, onde timócitos expressando TCRs que reconhecem o MHC da classe I se maturam em linfócitos T CD8; os que reconhecem o MHC de classe II se maturam em linfócitos T CD4. No entanto, esses linfócitos T CD4 apresentam baixa expressão de CD44. Qualquer processo mediado pelo TCR, como ativação celular, também causa aumento da expressão de CD44 (PUNT et al., 1996). O aumento da expressão de CD44 é um evento precoce durante a ativação celular, e seus níveis permanecem elevados indefinidamente (LESLEY et al., 1985; BUDD et al., 1987a; BUDD et al., 1987b; BUDD et al., 1987c; HAYNES et al., 1989; WILLEFORD et al., 1989; KELLY et al., 1988). Nos linfócitos T a molécula CD44 desempenha importante papel na adesão a células endoteliais, dirigindo a migração linfocitária para determinados tecidos linfóides periféricos, potencializando a secreção de interleucina 2 e 1 por linfócitos T e monócitos, respectivamente, através de sua ligação com o ácido hialurônico presente na matrix extracelular (HAYNES et al., 1989) e também aumentando a adesão com as APCs (CURTSINGER et al., 1998). Dessa maneira, desempenha papel fundamental no processo de ativação linfocitária.

O antígeno CD69 é expresso em timócitos CD3+, plaquetas, células de Langerhans e precursores mielóides na medula óssea; linfócitos T, B, macrófagos e células NK expressam CD69 somente quando ativados. Ele é considerado um marcador precoce da ativação linfocitária, com sua expressão aumentando a partir de 4 horas após o estímulo antigênico que inicia a atividade das proteínótirosoquinases, o fluxo intracelular de cálcio e a transcrição de interleucina 2 e do fator de necrose tumoral (CABTREE, 1989; TESTI et al., 1989; RISSO et al., 1991; SANTIS et al., 1992; D'AMBROSIO et al., 1993; CRISPIN et al., 1998; LIM et al., 1998; REA et al., 1999).

Após a seleção positiva no timo, os linfócitos T CD4 não expressam CD69 em suas membranas; no entanto após o processo de ativação celular a expressão de CD69 aumenta durante curto período de tempo, declinando aos níveis basais na ausência de novo estímulo antigênico (SWAIN e BRADLEY, 1992; SWAIN et al., 1996; JANEWAY et al., 1999). Apesar de suas características sugerirem sua participação no processo de ativação celular, sua função não é clara (CRISPIN et al., 1998).

A análise por citometria de fluxo dos marcadores de ativação linfocitária no grupo controle demonstrou ausência de expressão de CD25 e CD69 e expressão de CD44 de baixo peso molecular. Esses dados são compatíveis com o estado do sistema imune desses animais, visto que eles não receberam nenhum estímulo que desencadeasse maciça ativação linfocitária. Esses receptores se apresentaram de maneira idêntica nos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB. Os linfócitos T CD4 ativados expressam CD45RB de baixo peso molecular. Caso o anticorpo monoclonal anti-CD45RB causasse ativação linfocitária maciça, os resultados em termos de expressão de CD45RB poderiam ser os mesmos obtidos neste experimento, o que, entretanto, não ocorreu devido ao fato de que a expressão dos marcadores de ativação linfocitária (CD44, CD25 e CD69) nos animais do grupo controle, que não receberam nenhum estímulo, foi semelhante à expressão dos marcadores de ativação linfocitária nos animais do grupo tratado com o anticorpo anti-CD45RB. Isso reforça a hipótese de modulação do sistema imune com o anticorpo anti-CD45RB, visto que, se ocorresse ativação linfocitária, os dados obtidos por citometria de fluxo para a expressão de CD45RB não poderiam ser correlacionados com o aumento da sobrevida do enxerto e com a indução de tolerância.

5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica dos isoenxertos realizada no 120º dia de pós-operatório mostra a presença de um infiltrado inflamatório com tecido cicatricial reacional ao redor das ilhotas de Langerhans, possivelmente devido ao traumatismo tecidual durante o

procedimento de seu implante. Esse infiltrado não invade o interior das ilhotas, permanecendo somente na sua periferia. Ainda com essa técnica, demonstrou-se a presença de insulina no interior e ao redor das ilhotas de Langerhans indicando o seu funcionamento.

A análise histológica dos enxertos nos animais que apresentaram rejeição em todos os grupos de aloenxertos mostra um intenso infiltrado inflamatório invadindo o interior das ilhotas de Langerhans, destruindo sua arquitetura. Esses achados são compatíveis com a presença de hiperglicemia, visto que no momento em que ela ocorre já não existe massa suficiente de células β funcionantes. Diversos autores demonstraram essa mesma característica em transplantes de ilhotas de Langerhans e também em transplantes de outros órgãos em modelos experimentais (PANKEWYCZ et al., 1989; HAO et al., 1992; LENSCHOW et al., 1995; STEURER et al., 1995; GAINER et al., 1997; TRAN et al., 1997; BASADONNA et al., 1998; ZHENG, et al., 1999). Nesses estudos, a análise do infiltrado monomorfonuclear causador da reação de rejeição mostra que a maioria das células presentes são linfócitos T CD4 e CD8. Isso confirma o fato de que a resposta de rejeição a um aloenxerto ocorre de maneira similar à de uma resposta de hipersensitividade tardia em que principalmente os linfócitos T causam lise celular através da liberação de radicais livres de oxigênio.

Os animais sacrificados no 7º dia de pós-operatório nos grupos II, IV e V apresentaram um infiltrado inflamatório ao redor das ilhotas de Langerhans sem destruir sua arquitetura. Nessa fase da reação de rejeição não tinha ainda havido invasão no interior da estrutura das ilhotas de Langerhans com sua conseqüente destruição, a qual ocorreu nos animais do grupo II somente a partir do 10º dia de pós-operatório.

Os animais tratados com o anticorpo anti-CD45RB sacrificados no 7º dia de pós-operatório apresentaram um infiltrado inflamatório ao redor das ilhotas de Langerhans sem invasão do seu interior, resultado igual ao que apresentaram os animais que permaneceram euglicêmicos até o 120º dia de pós-operatório e ao dos animais submetidos a 2º transplante funcionante até o 50º pós-operatório. Esses achados são semelhantes aos encontrados por diversos autores após a indução de tolerância com o

mesmo anticorpo (BASADONNA et al., 1998) ou com outros anticorpos (PANKEWYCZ et al., 1989; HAO et al., 1992; LENSCHOW et al., 1995; STEURER et al., 1995; GAINER et al., 1997; TRAN et al., 1997; ZHENG, et al., 1999). Diversas teorias tentam explicar a presença desse infiltrado ao redor das ilhotas: segundo alguns autores, ele seria necessário para a manutenção da tolerância devido à habilidade que tem o clone de linfócitos T específicos ao antígeno de migrarem ao órgão alvo e liberar citocinas modulatórias características de linfócitos Th2 (PANKEWYCZ et al., 1989; HAO et al., 1992; TRAN et al., 1997; BASADONNA et al., 1998). BASADONNA et al. (1998) demonstraram que os linfócitos T CD4 infiltrando o tecido ao redor das ilhotas de Langerhans identificados através da técnica de imuno-histoquímica expressam baixas quantidades de CD45RB, características de linfócitos Th2.

Os animais do grupo tratado com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB apresentaram ainda a presença de discreta quantidade de fibroblastos ao redor das ilhotas, refletindo uma reação cicatricial em decorrência do procedimento do implante.

6 CONCLUSÃO

1. A administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB aumenta a sobrevida de aloenxertos de ilhotas de Langerhans em camundongos diabéticos.
2. A administração do anticorpo monoclonal anti-CD45RB induz tolerância imunológica a aloenxertos de ilhotas de Langerhans em camundongos diabéticos.
3. O aumento de sobrevida dos enxertos e a indução de tolerância imunológica através da intervenção no sinal 1 de ativação linfocitária com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB são dependentes dos estímulos negativos do sinal 2 através da molécula CTLA4.
4. O aumento do número de linfócitos T CD4 expressando CD45 de baixo peso molecular e a diminuição do número de linfócitos T CD4 expressando CD45 de alto peso molecular aumentam a sobrevida dos enxertos, assim como induzem tolerância imunológica nos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB.
5. Após o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD45RB, o incremento do número de linfócitos T CD4 expressando CD45 de baixo peso molecular está associado a incremento proporcional no número de linfócitos T CD4 expressando CTLA4 intracelular.

ANEXOS

1	Glicemia no pré-operatório	113
2	Glicemia no pós-operatório grupo I (isoenxertos)	114
3	Glicemia no pós-operatório grupo II (aloenxerto)	114
4	ANEXO 4 - Glicemia no pós-operatório grupo III (anti-CD45RB)	115
5	Glicemia no pós-operatório grupo IV (anti-CTLA4)	116
6	Glicemia no pós-operatório grupo V (anti-CD45RB+anti-CTLA4)	116
7	Número de células avaliadas grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB) – sem transplante	117
8	Expressão de CD45RB nos tubos 5-7 (grupo I - controle) e 5'-7' (grupo II - anti-CD45RB) – sem transplante	119
9	Expressão de CTLA4 de superfície nos linfócitos T CD4 de alto e baixo PM — grupo I e grupo II – sem transplante	119
10	Expressão de CTLA4 intracelular nos linfócitos T CD4 grupo I e grupo II – sem transplante	120
11	Expressão de IgG de hamster intracelular nos linfócitos T CD4 — grupo I e grupo II – sem transplante	120
12	Número de células avaliadas grupo II (aloenxerto) grupo III (Anti-CD45RB)	121
13	Número de células avaliadas grupo IV (anti-CTLA4) — Grupo V (anti-CD45RB+anti-CTLA4)	122
14	Expressão de CD45RB nos tubos 5-7 (grupo II - Controle) e 5'-7' (grupo III - anti-CD45RB)	123
15	Expressão de CD45RB nos tubos 5-7 (grupo IV – anti-CTLA4) e 5'-7' (grupo V - anti-CD45RB+anti-CTLA4)	123
16	Expressão de CTLA4 de superfície em linfócitos T CD4 grupo II (aloenxerto - controle) e grupo III (anti-CD45RB)	124
17	Expressão de CTLA4 de superfície em linfócitos T CD4 grupo IV (anti-CTLA4) e grupo V (anti-CD45RB+anti-CTLA4)	124
18	Expressão de CTLA4 intracelular em linfócitos T CD4 grupo II (aloenxerto - controle) e grupo III (anti-CD45RB)	124
19	Expressão de CTLA4 intracelular em linfócitos T CD4 grupo IV (anti-CTLA4) e grupo V (anti-CD45RB+anti-CTLA4)	125
20	Expressão de IgG de hamster intracelular em linfócitos T CD4 — Grupo II (aloenxerto - controle) e grupo III (anti-CD45RB)	125
21	Expressão de IgG de hamster intracelular em linfócitos T CD4 — grupo IV (anti-CTLA4) e grupo V (anti-CD45RB+anti-CTLA4)	125
22	Expressão de anti-CD45RB (C36316A FITC)	127
23	Expressão de GAR-FITC (8º dia)	127
24	Expressão de CD25 grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)	127
25	Expressão de CD44 grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)	128
26	Expressão de CD69 grupo I (controle) e grupo II (anti-CD45RB)	128

ANEXO 1 - GLICEMIA NO PRÉ-OPERATÓRIO (mg/dl)

PO	Grupo									
	I		II		III		IV		V	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1	438	487	456	467	461	420	400	429	488	559
2	406	574	497	499	501	532	578	567	551	597
3	532	540	502	512	581	573	597	591	446	430
4	90	401	412	411	422	404	520	535	449	444
5	423	465	400	410	471	496	500	457	423	426
6	532	555	404	409	412	487	478	447	544	549
7	498	476	476	445	456	492	456	464	554	587
8	543	546	501	498	501	590	435	432	481	512
9	498	436	-	-	486	520	-	-	522	513
10	445	476	-	-	482	588	-	-	475	498
11	-	-	-	-	443	457	-	-	501	456
12	-	-	-	-	476	489	-	-	478	470
13	-	-	-	-	412	445	-	-	465	451
14	-	-	-	-	479	467	-	-	-	-
15	-	-	-	-	435	489	-	-	-	-
16	-	-	-	-	514	503	-	-	-	-
17	-	-	-	-	455	433	-	-	-	-

Grupo I – isoenxertos; grupo II - aloenxertos sem tratamento; grupo III – aloenxertos tratados com anti-CD45RB; grupo IV – aloenxertos tratados com anti-CTLA4; grupo V – aloenxertos tratados com combinação anti-CD45RB e anti-CTLA4; a – glicemia 7 dias após injeção estreptozocina; b – glicemia no pré operatório imediato

Anexo 2 - GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO GRUPO I (ISOENXERTOS)

Dia	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	105	112	132	121	109	103	113	118	92	98
5	101	156	110	87	137	88	129	110	79	110
7	102	99	82	116	113	101	127	103	92	111
10	105	78	81	121	130	78	126	118	97	118
15	83	85	105	111	129	89	135	128	98	128
20	106	87	102	110	126	82	146	134	110	134
25	164	121	139	118	135	94	156	137	100	137
30	124	111	105	128	146	113	143	135	103	130
35	108	110	85	134	156	90	101	146	102	129
40	137	118	123	137	143	134	105	156	134	126
45	119	128	123	130	158	154	83	143	104	135
50	108	134	134	129	78	156	106	158	145	146
55	123	137	167	126	85	123	164	78	134	156
60	129	130	134	135	87	143	124	85	126	132
65	132	129	154	146	121	139	108	87	128	101
70	134	126	127	156	111	124	137	121	134	134
75	122	135	138	130	110	127	129	111	123	154
80	134	146	123	101	118	134	126	110	145	127
85	145	156	156	105	134	139	135	118	123	138
90	130	143	134	83	154	135	146	134	85	127
95	136	158	154	106	127	136	156	135	87	134
100	129	134	143	164	138	138	143	146	121	139
105	127	167	125	124	123	132	158	156	111	135
110	123	159	152	108	156	121	78	143	110	136
115	148	134	123	137	134	111	85	158	118	138
120	132	143	126	119	154	126	134	78	124	132
125	367	465	398	401	444	320	502	417	380	418

ANEXO 3 - GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO GRUPO II (ALOENXERTO)

Dia	Animal							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3	112	145	117	107	82	132	134	105
5	102	181	142	99	74	112	137	114
7	128	134	133	108	102	125	112	121
10	322	159	121	159	427	-	-	-
15	431	500	461	410	444	-	-	-
20	-	496	488	435	-	-	-	-

ANEXO 4 - GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO GRUPO III (ANTI-CD45RB)

Dia	Animal																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	11	12	13	14	15	16	17
3	97	104	101	111	120	106	109	112	98	89	120	110	117	126	113	113	108
5	79	122	110	81	115	92	78	103	90	78	123	102	119	87	98	110	90
7	100	132	97	97	113	105	103	117	107	111	113	129	109	134	107	123	101
10	87	106	103	84	107	102	116	97	99	134	117	122	106	143	-	-	-
15	83	110	114	111	118	107	83	92	103	99	124	114	93	110	-	-	-
20	100	117	90	105	122	124	139	122	128	164	119	106	100	114	-	-	-
25	115	109	120	102	130	110	109	133	122	121	122	95	104	136	-	-	-
30	87	134	122	343	109	102	119	118	85	160	132	98	104	127	-	-	-
35	114	290	410	312	104	74	117	102	97	102	115	106	141	115	-	-	-
40	95	333	400	-	124	97	116	106	109	105	105	117	102	127	-	-	-
45	126	-	-	-	112	102	100	102	123	118	104	104	99	149	-	-	-
50	97	-	-	-	109	115	439	88	114	108	112	105	113	143	-	-	-
55	102	-	-	-	415	102	321	123	121	94	106	104	147	136	-	-	-
60	98	-	-	-	500	95	-	122	106	132	99	123	176	155	-	-	-
65	134	-	-	-	-	134	-	115	102	123	123	108	123	114	-	-	-
70	115	-	-	-	-	115	-	132	119	127	130	113	143	125	-	-	-
75	109	-	-	-	-	113	-	385	125	112	100	103	108	99	-	-	-
80	103	-	-	-	-	108	-	442	113	380	101	142	134	91	-	-	-
85	119	-	-	-	-	145	-	-	125	387	105	123	121	120	-	-	-
90	122	-	-	-	-	121	-	-	132	-	117	145	97	123	-	-	-
95	107	-	-	-	-	121	-	-	127	-	108	132	122	137	-	-	-
100	117	-	-	-	-	134	-	-	112	-	112	144	132	123	-	-	-
105	146	-	-	-	-	129	-	-	108	-	111	112	112	139	-	-	-
110	135	-	-	-	-	132	-	-	103	-	103	154	108	122	-	-	-
115	122	-	-	-	-	111	-	-	123	-	95	109	106	143	-	-	-
120	145	-	-	-	-	127	-	-	114	-	123	104	104	118	-	-	-
125	365	-	-	-	-	409	-	-	398	-	401	445	367	387	-	-	-
-	2º Tx	-	-	-	-	2º Tx	-	-	2º Tx	-	2º Tx	2º Tx	2º Tx	2º Tx	-	-	-
-	BALB/c	-	-	-	-	CBA/H	-	-	BALB/c	-	CBA/H	BALB/c	CBA/H	BALB/c	-	-	-
3	112	-	-	-	-	132	-	-	101	-	102	132	105	123	-	-	-
5	121	-	-	-	-	125	-	-	109	-	112	123	121	124	-	-	-
10	103	-	-	-	-	109	-	-	112	-	136	112	332	128	-	-	-
15	111	-	-	-	-	298	-	-	103	-	445	134	345	112	-	-	-
20	105	-	-	-	-	318	-	-	104	-	440	127	-	109	-	-	-
25	98	-	-	-	-	-	-	-	318	-	-	109	-	132	-	-	-
30	114	-	-	-	-	-	-	-	445	-	-	123	-	122	-	-	-
35	134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128	-	117	-	-	-
40	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	119	-	123	-	-	-
45	115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	116	-	118	-	-	-
50	117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121	-	127	-	-	-

Tx – transplante; BALB/c – camundongos BALB/c como doadores; CBA – camundongos CBA como doadores.

ANEXO 5 - GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO GRUPO IV (ANTI-CTLA4)

Dia	Animal							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3	198	138	116	103	128	123	112	109
5	106	124	107	116	120	145	103	98
7	118	134	118	108	115	109	109	130
10	179	137	120	407	110	-	-	-
15	368	324	508	459	490	-	-	-
20	397	289	446	-	445	-	-	-

ANEXO 6 - GLICEMIA NO PÓS-OPERATÓRIO GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

Dia	Animal												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
3	188	127	112	100	134	130	118	99	104	132	119	102	113
5	145	101	96	80	128	78	123	88	91	116	102	97	106
7	122	120	119	110	118	102	122	129	119	128	107	92	123
10	137	132	130	101	117	82	143	110	106	148			
15	208	145	157	100	130	142	138	104	122	134			
20	-	418	123	120	170	518	377	132	92	484			
25	-	-	538	599	366	-	-	440	402	-			

**ANEXO 7 - NÚMERO DE CÉLULAS AVALIADAS GRUPO I
(CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB) – SEM TRANSPLANTE**

(Continua)

Animal	Tubo	Grupo I			Grupo II		
		n	R1	R2	n	R1	R2
1	1	6.570	5.895	-	-	-	-
1	2	4.440	3.956	-	-	-	-
1	3	2.040	1.416	-	-	-	-
1	4	2.040	1.784	454	-	-	-
1	5-5'	2.745	1.110	336	3.840	2.793	835
1	6-6'	10.275	7.519	2.065	10.215	7.855	2.183
1	7-7'	2.280	1.275	384	3.840	2.597	833
1	Total 5-7	15.765	9.904	2.785	17.895	13.245	3.851
1	8-8'	4.028	2.897	973	3.244	2.389	908
1	9-9'	3.778	2.228	766	3.468	2.456	876
1	10	3.346	2.217	-	-	-	-
1	11	2.024	1.987	-	-	-	-
1	12-12'	10.633	4.553	1.918	7.976	2.333	1.774
1	13-13'	9.294	3.475	1.156	8.036	4.503	1.987
1	14-14'	9.554	3.427	1.129	8.558	4.443	1.797
2	1	10.650	7.506	-	-	-	-
2	2	10.215	3.369	-	-	-	-
2	3	10.050	7.545	-	-	-	-
2	4	10.087	7.658	1.913	-	-	-
2	5-5'	10.185	6.500	1.760	10.245	6.390	1.538
2	6-6'	12.090	7.157	2238	10.125	6.429	2.317
2	7-7'	10.175	6.283	1.890	10.125	7.596	2.670
2	Total 5-7	32.450	19.940	5.888	30.495	20.415	6.525
2	8-8'	3.187	2.780	727	3.435	1.740	446
2	9-9'	3.205	2.721	527	3.397	1.596	376
2	10	3.456	2.457	-	-	-	-
2	11	3.241	2.180	-	-	-	-
2	12-12'	3.103	1.649	460	3.424	2.207	457
2	13-13'	3.256	2.624	614	3.407	2.288	427
2	14-14'	3.206	2.123	598	3.532	1.897	368
3	1	10.000	7.514	-	-	-	-
3	2	10.000	7.014	-	-	-	-
3	3	10.000	8.587	-	-	-	-
3	4	10.000	6.826	1.281	-	-	-
3	5-5'	10.000	6.444	1.508	10.000	6.401	2.285
3	6-6'	10.000	8.446	2.289	10.000	8.138	2.937
3	7-7'	10.000	8.495	2.567	10.000	8.158	3.046
3	Total 5-7	30.000	23.385	6.364	30.000	22.697	8.268
3	8-8'	3.153	1.361	470	3.230	1.562	515
3	9-9'	3.154	.928	206	3.240	1.660	463
3	10	3.089	2.098	-	-	-	-
3	11	3.123	2.210	-	-	-	-
3	12-12'	3.154	2.111	742	3.281	2.087	596
3	13-13'	3.119	2.068	603	3.261	1.968	604
3	14-14'	3.161	2.718	652	3.261	2.108	556
4	1	10.000	6.827	-	-	-	-
4	2	10.000	7.223	-	-	-	-
4	3	10.000	8.494	-	-	-	-
4	4	10.000	6.879	2.017	-	-	-
4	5-5'	10.000	5.344	1.333	10.000	5.880	1.776

**ANEXO 7 - NÚMERO DE CÉLULAS AVALIADAS GRUPO I
(CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB) – SEM TRANSPLANTE**

(Conclusão)

Animal	Tubo	Grupo I			Grupo II		
		n	R1	R2	n	R1	R2
4	6-6'	10.000	8.817	2.296	10.000	7.684	2.650
4	7-7'	10.000	8.613	2.534	10.000	8.125	3.251
4	Total 5-7	30.000	22.774	6.163	30.000	21.689	7.677
4	8-8'	3.315	1.353	376	3.283	2.500	871
4	9-9'	3.342	1.139	386	3.201	2.160	679
4	10	3.224	1.489	-	-	-	-
4	11	3.107	1.995	-	-	-	-
4	12-12'	3.289	1.382	435	3.196	2.153	606
4	13-13'	3.298	1.533	396	3.246	1.916	587
4	14-14'	3.340	1.961	406	3.210	1.696	582
5	1	8.698	5.400	-	-	-	-
5	2	7.655	4.567	-	-	-	-
5	3	9.765	5.987	-	-	-	-
5	4	9.854	5.256	1.435	-	-	-
5	5-5'	7.104	5.425	1.797	7.037	5.829	1.835
5	6-6'	11.149	5.434	2.364	6.493	5.409	1.797
5	7-7'	9.772	5.773	2.083	7.739	6.340	1.914
5	Total 5-7	28.025	16.632	6.244	21.269	17.578	5.546
5	8-8'	3.322	762	211	3.347	2.050	808
5	9-9'	3.309	1.059	322	3.289	1.676	498
5	10	3.466	1.087	-	-	-	-
5	11	3.247	1.123	-	-	-	-
5	12-12'	3.204	871	194	3.370	1.532	539
5	13-13'	3.188	1.455	266	3.400	1.401	399
5	14-14'	3.264	1.183	202	3.406	1.433	402

n – número de esplenócitos avaliados; R1 – linfócitos; R2 – linfócitos T CD4.

ANEXO 8 - EXPRESSÃO DE CD45RB NOS TUBOS 5-7
(GRUPO I - CONTROLE) E 5'-7' (GRUPO II - ANTI-CD45RB) – SEM TRANSPLANTE

Animal	Tubo	Expressão de CD45 (% de linfócitos T CD4)			
		Grupo I (controle)		Grupo II (anti-CD45RB)	
		↑CD45RB	↓CD45RB	↑CD45RB	↓CD45RB
1	5 – 5'	71,73	28,27	9,46	90,54
1	6 – 6'	46,83	53,17	6,05	93,95
1	7 – 7'	40,36	59,64	6,24	93,76
1	Média	48,94	51,06	6,83	93,17
2	5 – 5'	59,38	40,62	2,73	97,27
2	6 – 6'	48,79	51,21	7,64	92,36
2	7 – 7'	50,80	49,20	9,51	90,49
2	Média	52,60	47,40	7,25	92,75
3	5 – 5'	63,06	61,54	26,35	73,65
3	6 – 6'	51,90	48,10	16,24	83,75
3	7 – 7'	54,52	45,48	15,23	84,77
3	Média	55,62	44,38	18,66	81,34
4	5 – 5'	57,99	42,01	22,52	77,48
4	6 – 6'	50,00	50,00	8,87	91,13
4	7 – 7'	47,28	52,72	9,10	90,90
4	Média	50,61	49,39	12,13	87,87
5	5 – 5'	59,38	40,62	10,84	89,16
5	6 – 6'	60,78	39,22	9,13	90,87
5	7 – 7'	58,81	41,19	14,63	85,37
5	Média	59,72	40,28	11,59	88,41

↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 9 - EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE NOS LINFÓCITOS T CD4 DE ALTO E BAIXO PM
GRUPO I E GRUPO II – SEM TRANSPLANTE

Animal	Expressão CTLA4 (linfócitos T CD4)					
	Grupo I (controle)			Grupo II (anti-CD45RB)		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	336	0,30	0	835	0,84	1,56
2	1.760	0,06	0,28	1.538	0,26	0,46
3	1.508	1,72	0,20	2.285	0,61	0,04
4	1.333	0,68	0,15	1.776	0,96	0,28
5	1.797	1,45	0,06	1.835	0,54	0,60

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 5 para grupo I e tubo 5' para grupo II); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB- linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

**ANEXO 10 - EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4
GRUPO I E GRUPO II – SEM TRANSPLANTE**

Animal	Expressão CTLA4 (linfócitos T CD4)					
	Grupo I (controle)			Grupo II (anti-CD45RB)		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	2.065	0,63	8,52	2.183	1,88	17,73
2	2.238	1,25	9,34	2.317	0,65	16,18
3	2.289	1,14	8,39	2.937	1,26	9,87
4	2.296	0,84	10,50	2.650	2,53	16,49
5	2.364	2,89	7,87	1.797	1,34	17,25

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 6 para grupo I e tubo 6' para grupo II); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB- linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

**ANEXO 11 - EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR NOS LINFÓCITOS T CD4
GRUPO I E GRUPO II – SEM TRANSPLANTE**

Animal	Expressão IgG de hamster (linfócitos T CD4)					
	Grupo I (controle)			Grupo II (anti-CD45RB)		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	384	1,56	1,30	833	0,60	1,20
2	1.890	0,93	0,64	2.670	0,76	0,49
3	2.567	1,09	0,65	3.046	1,21	1,84
4	2.534	0,36	0,47	3.251	0,18	1,20
5	2.083	1,92	1,15	1.914	2,80	2,30

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 7 para grupo I e tubo 7' para grupo II); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB- linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 12 - NÚMERO DE CÉLULAS AVALIADAS
GRUPO II (ALOENXERTO) GRUPO III (ANTI-CD45RB)

Animal	Tubo	Número de células avaliadas					
		Grupo II			Grupo III		
		n	R1	R2	n	R1	R2
1	1	1.020	679	-	-	-	-
1	2	7.560	5.535	-	-	-	-
1	3	5.025	3.538	-	-	-	-
1	4	10.000	7.327	2.208	-	-	-
1	5-5'	10.000	4.237	872	10.000	7.087	1.992
1	6-6'	10.000	7.298	1.700	10.000	8.436	2.901
1	7-7'	10.000	7.321	1.312	10.000	8.655	2.464
1	Total 5-7	30.000	18.856	3.884	30.000	24.178	7.357
2	1	10.000	4.205	-	-	-	-
2	2	10.000	4.203	-	-	-	-
2	3	10.000	7.654	-	-	-	-
2	4	10.000	4.356	927	-	-	-
2	5-5'	5.040	3.072	870	10.000	6.334	2.109
2	6-6'	8.745	2.437	764	10.000	8.596	2.495
2	7-7'	8.130	1.699	559	10.000	8.508	3.003
2	Total 5-7	21.915	7.208	2.193	30.000	23.438	7.607
3	1	10.000	7.301	-	-	-	-
3	2	10.000	9.001	-	-	-	-
3	3	10.000	8.769	-	-	-	-
3	4	10.000	7.160	1.960	-	-	-
3	5-5'	10.000	7.349	2.008	5.025	2.689	1.028
3	6-6'	10.000	6.579	1.994	4.395	2.220	667
3	7-7'	10.000	7.127	1.945	5.055	2.645	759
3	Total 5-7	30.000	21.055	5.947	14.475	7.554	2.454

n – número de esplenócitos avaliados; R1 – linfócitos; R2 – linfócitos T CD4.

ANEXO 13 - NÚMERO DE CÉLULAS AVALIADAS
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) — GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

Animal	Tubo	Número de células avaliadas					
		Grupo IV			Grupo V		
		n	R1	R2	n	R1	R2
1	1	10.000	4.021	-	-	-	-
1	2	10.000	3.765	-	-	-	-
1	3	10.000	5.484	-	-	-	-
1	4	10.000	3.989	897	-	-	-
1	5-5'	5.010	2.666	1.167		4.138	992
1	6-6'	8.265	4.491	1.734	10.000	6.120	1.393
1	7-7'	5.040	3.584	1.327	10.000	5.928	1.645
1	Total 5-7	18.315	8.075	4.228	30.000	16.186	4.030
2	1	1.035	637	-	-	-	-
2	2	4.020	2.256	-	-	-	-
2	3	5.025	2.886	-	-	-	-
2	4	3.525	2.313	1.354	-	-	-
2	5-5'	5.023	2.456	1.226	5.100	2.879	1.079
2	6-6'	4.566	1.968	1.348	10.000	7.382	2.200
2	7-7'	5.876	2.619	1.592	10.000	2.609	818
2	Total 5-7	15.465	7.043	4.166	20.215	12.870	4.097
3	1	10.000	2.388	-	-	-	-
3	2	10.000	1.982	-	-	-	-
3	3	10.000	2.329	-	-	-	-
3	4	10.000	2.658	887	-	-	-
3	5-5'	10.000	1.739	447	10.000	6.334	2.207
3	6-6'	10.000	1.510	393	6.180	3.504	1.163
3	7-7'	10.000	3.572	889	5.070	3.165	1.011
3	Total 5-7	30.000	6.821	1.729	21.250	13.003	4.381

n – número de esplenócitos avaliados; R1 – linfócitos; linfócitos T CD4.

ANEXO 14 - EXPRESSÃO DE CD45RB NOS TUBOS 5-7
(GRUPO II - CONTROLE) E 5'-7' (GRUPO III - ANTI-CD45RB)

Animal	Tubo	Expressão de CD45 (% de linfócitos T CD4)			
		Grupo II (controle)		Grupo III (anti-CD45RB)	
		↑CD45RB	↓CD45RB	↑CD45RB	↓CD45RB
1	5-5'	59,75	40,25	17,62	82,38
1	6-6'	53,89	46,11	5,66	94,34
1	7-7'	50,08	49,92	5,72	94,27
1	Média	53,91	46,09	8,92	91,08
2	5-5'	52,49	47,51	14,98	85,02
2	6-6'	52,35	47,65	5,69	94,31
2	7-7'	50,64	49,36	4,63	95,37
2	Média	51,98	48,02	7,85	92,15
3	5-5'	52,88	47,12	8,76	91,24
3	6-6'	50,63	49,37	5,61	94,39
3	7-7'	50,73	49,27	4,30	95,70
3	Média	51,44	48,56	6,34	93,66

↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 15 - EXPRESSÃO DE CD45RB NOS TUBOS 5-7
(GRUPO IV – ANTI-CTLA4) E 5'-7' (GRUPO V - ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

Animal	Tubo	Expressão de CD45 (% de linfócitos T CD4)			
		Grupo IV (anti-CTLA4)		Grupo V (anti-CD45RB+anti-CTLA4)	
		↑CD45RB	↓CD45RB	↑CD45RB	↓CD45RB
1	5-5'	37,79	62,21	35,28	64,72
1	6-6'	33,67	66,32	15,30	84,70
1	7-7'	33,08	66,91	15,32	84,68
1	Média	34,63	65,37	20,22	79,78
2	5-5'	50,49	49,51	23,17	76,83
2	6-6'	51,93	48,07	6,00	94,00
2	7-7'	50,89	49,18	6,36	93,64
2	Média	51,08	48,92	10,59	89,41
3	5-5'	57,71	42,29	23,74	76,26
3	6-6'	46,06	53,94	8,34	91,66
3	7-7'	47,24	52,76	8,01	91,99
3	Média	49,68	50,32	16,02	83,98

↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular

ANEXO 16 - EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)

Animal	Expressão CTLA4 superfície (linfócitos T CD4)					
	Grupo II			Grupo III		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	872	0,46	0,11	1.992	1,10	0,45
2	870	0,45	0,68	2.109	0,57	0,12
3	2.008	0,35	0,30	1.028	0,39	0,19

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 5 para grupo II e tubo 5' para grupo III); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 17 - EXPRESSÃO DE CTLA4 DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

Animal	Expressão CTLA4 superfície (linfócitos T CD4)					
	Grupo IV			Grupo V		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	1167	0,43	0	992	1,01	0,30
2	1226	0,32	0,40	1079	0,28	0,19
3	447	0,68	0	2207	0,41	0,09

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 5 para grupo IV e tubo 5' para grupo V); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 18 - EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)

Animal	Expressão CTLA4 intracelular (linfócitos T CD4)					
	Grupo II			Grupo III		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	1.700	1,71	10,82	2.901	0,52	22,20
2	764	0,39	8,50	2.495	0,68	17,92
3	1.994	0,55	9,02	667	2,10	20,09

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 6 para grupo II e tubo 6' para grupo III); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 19 - EXPRESSÃO DE CTLA4 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

Animal	Expressão CTLA4 intracelular (linfócitos T CD4)					
	Grupo IV			Grupo V		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	1.734	2,36	10,78	1.393	1,01	25,56
2	1.348	0,22	8,01	2.200	1,95	19,59
3	393	1,53	9,41	1.163	2,32	18,83

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 6 para grupo IV e tubo 6' para grupo V); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 20 - EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO II (ALOENXERTO - CONTROLE) E GRUPO III (ANTI-CD45RB)

Animal	Expressão IgG hamster intracelular (linfócitos T CD4)					
	Grupo II			Grupo III		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	1.312	0,69	1,14	2.464	0,81	2,90
2	559	0,36	0,36	3.003	0,70	2,33
3	1.945	0,36	0,41	759	0,66	2,64

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 7 para grupo II e tubo 7' para grupo III); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 21 - EXPRESSÃO DE IgG DE HAMSTER INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T CD4
GRUPO IV (ANTI-CTLA4) E GRUPO V (ANTI-CD45RB+ANTI-CTLA4)

Animal	Expressão IgG hamster intracelular (linfócitos T CD4)					
	Grupo IV			Grupo V		
	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)	R2 (n)	↑CD45RB (%)	↓CD45RB (%)
1	1.327	1,88	0,60	1.645	0,91	2,10
2	1.592	0,31	0,25	818	0,49	1,83
3	889	0,90	0,45	1.011	1,88	1,88

R2 – linfócitos T CD4 (tubo 7 para grupo IV e tubo 7' para grupo V); ↑CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de alto peso molecular; ↓CD45RB – linfócitos T CD4 expressando CD45RB de baixo peso molecular.

ANEXO 22 - EXPRESSÃO DE ANTI-CD45RB (C36316A FITC)

Animal	Expressão de C36316A FITC (linfócitos CD4)					
	Grupo I			Grupo II		
	R2 (n)	C36316A (%) (+)	C36316A (%) (-)	R2 (n)	C36316A (%) (+)	C36316A (%) (-)
1	973	99,49	0,51	908	99,34	0,66
2	727	99,86	0,14	446	99,78	0,22
3	470	99,79	0,21	515	99,81	0,19
4	376	100	0	871	99,66	0,34
5	762	99,52	0,47	808	99,26	0,74

R2 – linfócitos T CD4; C36316A (+) – linfócitos T CD4 expressando C36316A; C36316A (-) – linfócitos T CD4 não expressando C36316A

ANEXO 23 - EXPRESSÃO DE GAR-FITC (8º DIA)

Animal	Expressão de GAR-FITC (linfócitos CD4)					
	Grupo I			Grupo II		
	R2 (n)	GAR (%) (+)	GAR (%) (-)	R2 (n)	GAR (%) (+)	GAR (%) (-)
1	766	1,83	98,17	876	1,94	98,06
2	527	2,09	97,91	376	3,46	96,55
3	206	0,97	99,03	463	1,94	98,06
4	386	1,04	98,96	679	1,18	98,82
5	322	0	100	498	1,20	98,80

R2 – linfócitos T CD4; GAR-FITC – anticorpo de cabra anti-rato conjugado com FITC; GAR (+) – linfócitos T CD4 expressando GAR-FITC; GAR (-) – linfócitos T CD4 não expressando GAR-FITC.

ANEXO 24 - EXPRESSÃO DE CD25 — GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)

Animal	Expressão CD25 (linfócitos T CD4)					
	Grupo I			Grupo II		
	R2 (n)	CD25 (%) (+)	CD25 (%) (-)	R2 (n)	CD25 (%) (+)	CD25 (%) (-)
1	1.918	13,35	86,65	1.774	10,03	89,97
2	460	11,74	88,26	457	13,57	86,46
3	742	42,45	57,55	596	13,09	86,91
4	435	11,72	88,28	606	14,36	85,64
5	194	18,49	81,51	539	10,58	89,62

R2 – linfócitos T CD4; CD25(+) - linfócitos T CD4 expressando CD25; CD25(-) - linfócitos T CD4 não expressando CD25.

ANEXO 25 - EXPRESSÃO DE CD44 — GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)

Animal	Expressão CD44 (linfócitos T CD4)					
	Grupo I			Grupo II		
	R2 (n)	↑CD44 (%)	↓CD44 (%)	R2 (n)	↑CD44 (%)	↓CD44 (%)
1	1.156	54,50	45,50	1.987	44,94	55,06
2	614	65,96	34,04	427	54,10	45,90
3	603	56,72	43,28	604	55,30	44,70
4	396	55,81	44,19	587	46,34	53,60
5	266	54,14	45,86	399	50,88	49,12

R2 – linfócitos T CD4; ↑CD44 - linfócitos T CD4 com alta expressão de CD44; ↓CD44 – linfócitos T CD4 com baixa expressão de CD44.

ANEXO 26 - EXPRESSÃO DE CD69 — GRUPO I (CONTROLE) E GRUPO II (ANTI-CD45RB)

Animal	Expressão de CD69 (linfócitos T CD4)					
	Grupo I			Grupo II		
	R2 (n)	CD69 (%) (+)	CD69 (%) (-)	R2 (n)	CD69 (%) (+)	CD69 (%) (-)
1	1.129	24,27	75,73	1.797	28,82	71,18
2	598	32,44	67,56	368	25,82	74,18
3	652	26,22	73,78	556	21,30	77,70
4	406	22,66	77,34	582	21,31	78,69
5	202	31,62	68,38	402	18,42	81,58

R2 – linfócitos T CD4; CD69 (+) - linfócitos T CD4 expressando CD69; CD69 (-) - linfócitos T CD4 não expressando CD69.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALEGRE, M.L.; NOEL, P.J.; EISFELDER, B.J. et al. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on mouse T cells. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 11, p. 4762-4770, Dec. 1996.
- 2 ALEJANDRO, R.; MINTZ, D.H.; NOEL, J. et al. Islet cell transplantation in type I diabetes mellitus. **Transplantation Proceedings**, v. 19, n. 1, p. 2359-2361, 1987.
- 3 ALEJANDRO, R.; ANGELICO, M.C.; RICORDI, C. et al. More then 5-year islet allograft function in insulin-dependent diabetes mellitus. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n. 4, p. 2229-2230, June 1997.
- 4 ALEJANDRO, R.; KENYON, N.S.; CHATILA, A. et al. Islet transplantation alone in type 1 diabetes mellitus. **Transplantation**, v. 67, n. 7, p. S172, Apr. 1999.
- 5 ALLISON, J.P. CD28-B7 interactions in T cell activation. **Current Opinions in Immunology**, v.6, n. 3, p. 414-419, June 1994.
- 6 AMAMOO, D.G.; WOODS, J.E.; HALLEY, K.E. Effect of intrahepatically implanted islets of Langerhans on hepatic function in the rat. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 50, n. 7, p. 416-419, July 1975.
- 7 ANDERSON, A. Islet implantation normalizes hyperglycaemia caused by streptozocin induced insulin. **Lancet**, v. 2, p. 581-584, Sept. 1979.
- 8 ARUFFO, A.; KANNER, S.B.; SGROI, D. et al. CD22-mediated stimulation of T cells regulates T-cell receptor CD3-induced signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 21, p. 10242-10246, Nov. 1992.
- 9 ASAKURA, T.; GRAY, D.W.R.; OZASA, T. et al. An investigation of tolerance induction following islet allotransplantation in the mouse. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n. 1-2, p. 1152, Feb. 1997.
- 10 AUERSWALD, L.; ROTHSTEIN, D.; OLIVEIRA, S. et al. Indefinite islet allograft survival in mice after a short course of treatment with anti-CD45 monoclonal antibodies. **Transplantation**, v. 63, n. 9, p. 1355-1358, May 1997.
- 11 BALLINGER, W.F.; LACY, P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. **Surgery**, v. 72, n. 2, p. 175-186, Aug. 1972.

- 12 BANTING, F.G.; BEST, C.H.; GOLLIP, J.B. et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 12, p. 41-146, 1922.
- 13 BANTING, F.G.; BEST, C.H. The internal secretion of the pancreas. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 7, p. 256-271, 1922.
- 14 BARBER, E.K.; DASGUPTA, J.D.; SCHLOSSMAN, S.F. et al. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 9, p. 3277-3281, May 1989.
- 15 BASADONNA, G.P.; AUERSWALD, L.; KHUONG, C.Q. et al. Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms : a novel immunotherapeutic strategy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3821-3826, Mar. 1998.
- 16 BENSLEY, R.R. Studies on the pancreas of the guinea pig. **The American Journal of Anatomy**, v. 12, n. 3, p. 297-388, 1911.
- 17 BERKE, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes; molecular and cellular aspects. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 735-769, 1994.
- 18 BIERKELAND, M.R.; KRAUS, T.; TARDELLI, L. et al. Progressive changes in CD45RB phenotype and lymphokine production by murine CD4+ T cells after alloantigen exposure. **Immunology**, v. 75, n. 4, p. 632-638, Apr. 1992.
- 19 BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L.; MEDAWAR, F.R.S. Actively acquired tolerance of foreign cells. **Nature**, v. 172, p. 603-606, Oct. 1953.
- 20 BILLINGHAM, R.E.; KROHN, P.L.; MEDAWAR, P.B. Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1157-1163, 1951.
- 21 BILOUS, R.W.; MAURER, S.M.; SUTHERLAND, D.E.R. et al. The effects of pancreas transplantation on glomerular structure of renal allografts in patients with insulin-dependent diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 2, p. 80-85, 1989.
- 22 BOHAN, S.O.; WILCZEC, H.; TYDEN, G. Recurrent diabetic nephropathy in renal transplant placed in diabetic patients and the protective effect of simultaneous pancreatic transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 19, p. 2290-2292, 1987.
- 23 BONNEFOY-BERARD, N.; VINCENT, C.; REVILLARD, J.P. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. **Transplantation**, v. 51, n. 3, p. 669-673, Mar. 1991.

- 24 BOOM, W.H.; LIANO, D.; ABBAS, A.K. Heterogeneity of helper/inducer T Lymphocytes. II effects of interleukin 4 and interleukin 2 promoting T cell clones on resting B lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 4, p. 1350-1355, Apr. 1988.
- 25 BOTTOMLY, K.; LUQMAN, M.; GREENBAUM, L. et al. A monoclonal antibody to murine CD45R distinguishes CD4 T cell populations that produce different cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 19, n. 4, p. 617-623, Apr. 1989.
- 26 BOWEN, K.M.; ANDRUS, L.; LAFFERTY, K. Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients. **Diabetes**, v. 29, suppl. 1, p. 98-104, 1980.
- 27 BRAZELTON, T.R.; MORRIS, R.E. Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs : tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), micophenolate mofetil and leflunomide. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 5, p. 710-720, Oct. 1996.
- 28 BRETSCHER, P.; COHN, M. A theory of self-nonsel discrimination. **Science**, v. 169, p. 1042-1049, Sept. 1970.
- 29 BROE, P.J.; MEHIGAN, D.G.; CAMERON, J.L. Pancreatic transplantation. **Surgical Clinics of North America**, v. 61, n. 1, p. 85-98, Feb. 1981.
- 30 BROOKS, C.G.; HOLSCHER, M. Cell surface molecules involved in NK recognition by cloned cytotoxic T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 5, p. 1331-1337, Mar. 1987.
- 31 BROWNING, H.; RESNIK, P. Homologous and heterologous transplantation of pancreatic tissue in normal and diabetic mice. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 26, p. 141-152, 1952.
- 32 BRUNET, J.F.; DENIZOT, F.; LUCIANI, M. et al. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA4. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 267-270, July 1987.
- 33 BRUNSCHWIG, A. Resection of the head of the pancreas and duodenum for carcinoma-pancreatoduodenectomy. **Surgery Gynecology and Obstetrics**, v. 65, p. 681-684, 1937.
- 34 BUDD, R.C.; CEROTINNI, J.C.; HORVARTH, C. et al. Distinction of virgin and memory l lymphocytes : stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic activation. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 10, p. 3120-3129, May 1987a.
- 35 BUDD, R.C.; CEROTINNI, J.C.; MACDONALD, H.R. Phenotypic identification of memory cytolytic T lymphocytes in a subset of Lyt-2+ cells. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 4, p. 1009-1013, Feb. 1987b.

- 36 BUDD, R.C.; CEROTINNI, J.C.; MACDONALD, H.R. Selectively increased production of interferon- γ by subsets of Ly2+ and L3T4+ T cells identified by expression of Pgp-1. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 11, p. 3583-3586, June 1987c.
- 37 BUGEON, L.; CUTURI, M.C.; HALLET, M.M. et al. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats : characterization by low interleukin-2 and interferon- γ mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. **Transplantation**, v. 54, n. 2, p. 219-225, Aug. 1992.
- 38 BURKLY, L.; LO, D.; KANAGAWA, R.; BRINSTER, R. et al. T cell tolerance by clonal anergy in transgenic mice with nonlymphoid expression of MHC class II I-E. **Nature**, v. 342, n. 6249, p. 564-566, Nov. 1989.
- 39 BUSHELL, A.; ROY-CHAUDHURY, P.; MANFRO, R. IL-4 does not influence the rate of cardiac allograft engraftment : studies in IL-4 knockout mice. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, p. 1882-1886, 1996.
- 40 BUSNARDO, A.C.; DIDIO, L.J.A.; TIDRICK, R.T. et al. History of the pancreas. **The American Journal of Surgery**, v. 146, p. 539-550, 1983.
- 41 CABTREE, G.R. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. **Science**, v. 243, p. 355-361, 1989.
- 42 CALNE, R.Y.; MURRAY, J.E. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs. **Surgical Forum**, v. 12, p. 118-120, 1961.
- 43 CALNE, R.Y.; ROLLES, K.; WHITE, D.J.G. et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs : 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. **Lancet**, v. 2, n. 8151, p. 1033-1036, Nov. 1979.
- 44 CANTAROVICH, D.; GIRAL-CLASSE, M.; KARAM, G. et al. Are patients undergoing simultaneous kidney and pancreas (SPK) transplantation exposed to a higher risk of kidney graft loss and mortality? **Transplantation**, v. 67, n. 7, p. S175, 1999.
- 45 CARPENTER, C.B. Mechanisms of prolongation of graft survival. **Transplantation Proceedings**, v. 11, n. 4, p. 1885-1888, Dec. 1979.
- 46 CARTER, W.G.; WAYNER, E.A. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 9, p. 4193-4201, Mar. 1988.
- 47 CHABORNNEAU, H.; TONKS, N.K.; WALSH, K.A. et al. The leukocyte common antigen (CD45) : a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 7182-7186, 1988.

- 48 CHAHINE, A.A.; YU, M.; MCKERMAN, M. et al. Local CTLA4Ig synergizes with one-dose anti-LFA-1 to achieve long-term acceptance of pancreatic islet allografts. **Transplantation Proceedings**, v. 26, n. 6, p. 3296, Dec. 1994.
- 49 CHUNG, J.; KUO, C.J.; CRABTREE, G.R. et al. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70Kd S6 protein kinases. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1227-1236, June 1992.
- 50 CIUBOTARIU, R; LIU, Z.; COLOVAI, A.I. et al. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 398-405, 1998.
- 51 CLARK, E.A. CD22, a B cell-specific receptor, mediates adhesion and signal transduction. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 4715-4718, June 1993.
- 52 COFFMAN, R.L.; WEISSMAN, I.L. B220 : a Bcell-specific member of the T200 glycoprotein family. **Nature**, v. 289, n. 5799, p. 681-683, Feb. 1981.
- 53 COUET, C.; GENTON, P.; POINTEL, J.P. et al. The prevalence of retinopathy is similar in diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis with or without pancreatectomy and in idiopathic diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 8, n. 4, p. 323-328, July 1985.
- 54 COULOMBE, M; LAFFERTY, K.J.; GILL, R.G. Nature of tolerance induction to peripheral (extrathymic) allografts. **Transplantation Proceedings**, v. 26, n. 2, p. 720-721, Apr. 1994.
- 55 COULOMBE, M.; GILL, R.G. Tolerance induction to cultured islet allografts : I. characterization of the tolerant state. **Transplantation**, v. 57, n. 8, p. 1195-1200, Apr. 1994a.
- 56 COULOMBE, M.; GILL, R.G. Tolerance induction to cultured islet allograft. **Transplantation**, v. 57, n. 8, p. 1201-1207, Apr. 1994b.
- 57 COULOMBE, M.; YANG, H.; GUERDER, S. et al. The role of MHC antigen and the lymphocyte costimulator B7-1. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 11, p. 4790-4795, Dec. 1996.
- 58 COUPLAND, R.E. The survival and growth of pancreatic tissue in the anterior chamber of the eye of the albino rat. **Journal of Endocrinology**, v. 20, p. 69-77, 1960.
- 59 CRISPIN, J.C.; MARTINEZ, P.; PABLO, P. et al. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 48, n. 2, p. 196-200, Aug. 1998.

- 60 CULTY, M.; MIYAKE, K.; KINCADE, P.W. et al. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. **Journal of Cellular Biology**, v. 111, n. 3, p. 2765-2774, Dec. 1990.
- 61 CURTSINGER, J.M.; LINS, D.C.; MESCHER, M.F. CD8+ memory T cells (CD44 high, Ly-6C+) are more sensitive than naive cells (CD44low, Ly-6C-) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3236-3243, Apr. 1998.
- 62 DALLMAN, M.J.; LARSEN, C.P.; MORRIS, P.J. Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts : analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 2, p. 493-496, Aug. 1991.
- 63 D'AMBROSIO, D.; TROTA, R.; VACCA, A. et al. Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69 generated signal. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 11, p. 2993-2997, Nov. 1993.
- 64 DAMIE, N.K.; KLUSSMAN, K.; LEYTZE, G. et al. Costimulation and T lymphocytes with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induces functional expression of CTLA4, a second receptor for B7. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 6, p. 2686-2697, Mar. 1994.
- 65 D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ production by supressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in acessory cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 3, p. 1042-1048, Sept. 1993.
- 66 DAUCHAU, R.; KIRKLEY, J.; FABRE, J.W. Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W3/13 antigen of the rat. **European Journal of Immunology**, v. 10, n. 10, p. 745-749, Oct. 1980.
- 67 DEANS, J.P.; KANNER, S.B.; TORRES, R.M. et al. Interaction of CD4 : lck with the T cell receptor / CD3 complex induces early signaling events in the absence of CD45 tyrosine phosphatase. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 3, p. 661-68, Mar. 1992.
- 68 DEMPSTER, W.J.; LENNOX, B.; BOAG, J.W. Prolongation of survival of skin homotransplants in the rabbit by irradiation of the host. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 31, p. 670-679, 1950.
- 69 DING, L.; LINSLEY, P.S.; HUANG, L.Y. et al. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 3, p. 1224-1234, Aug. 1993.

- 70 DOBSON, M. Experiments and observations on the urine in diabetes. **Medical Observations and Inquires**, v. 5, p. 298-316, 1776.
- 71 DUBOIS, A.M.; GONET, A. Effects de la greffe de pancreas foetal sur la glycemie et la regeneration des ilots de Langerhans de rats alloxanises on pancreatectomies. **Acta Anatomie**, v. 41, p. 336, 1960.
- 72 ENGEL, P.; NOJIMA, Y.; ROTHSTEIN, D. et al. The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erithrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 150, p. 4719-4732, n. 11, June 1993.
- 73 FABIAN, M.C.; LAKEY, J.R.T.; RAJOTTE, R.V. et al. Rapamycin prolongs murine islet allograft survival. **Transplantation Proceedings**, v. 24, n. 6, p. 2842, Dec. 1992.
- 74 FABRE, J.W.; WILLIAMS, A.F. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat lymphocyte serum and preliminary biochemical characterization of the major antigen recognized. **Transplantation**, v. 23, n. 4, p. 349-359, Apr. 1977.
- 75 FABRE, J.W.; SUNDERLAND, C.A.; WILLIAMS, A.F. Immunosuppressive properties of rabbit antibodies against a major glycoprotein restricted to rat leucocytes membranes. **Transplantation**, v. 30, p. 167-173, 1980.
- 76 FARNEY, A.C.; SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet transplantation. In: GO, V.L.W. **The pancreas : biology, pathobiology and disease**. New York : Raven Press, 1993. v. 1, p. 815-835.
- 77 FAUSTMAN, D.; HAUPTFELD, V.; LACY, P. et al. Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islets with antibody directed to Ia determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 8, p. 5156, Aug. 1981.
- 78 FELDMAN, S.D.; DODI, G.; HARD, K. et al. Intrasplenic islets isografts. **Surgery**, v. 82, n. 3, p. 386-394, Sept. 1977.
- 79 FERGUSON, J.; SCOTHORNE, R.J. The survival of transplanted isolated pancreatic islets in the omentum and testis. **British Journal of Surgery**, v. 60, n. 11, p. 907, Nov. 1973.
- 80 FINCH, D.R.A.; MORRIS, P.J. Passive enhancement of isolated pancreatic islets allografts. **Transplantation**, v. 22, n. 5, p. 508-512, Nov. 1976.
- 81 FINCH, D.R.A.; WISE, P.H.; MORRIS, P.J. Successful intrasplenic transplantation of syngeneic and allogeneic isolated pancreatic islets. **Diabetologia**, v. 13, n. 3, p. 195-199, May 1977.
- 82 FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P. et al. IL-10 acts on antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 10, p. 3444-3450, May 1991.

- 83 FISCHER, E.H.; CHARBONNEAU, H.; TONKS, N.K. Protein tyrosine phosphatases : a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. **Science**, v. 253, n. 5018, p. 401-406, July 1991.
- 84 FOWELL, D; MCKNIGHT, A.J.; POWRIE, F. et al. Subsets of CD4 T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity. **Immunology Review**, v. 123, p. 37-44, Oct. 1991.
- 85 FOWELL, D.; MASON, D. Evidence that the T cell repertoire of normal rat contain cells with the potential to cause diabetes : characterization of the CD4 T cell subset that inhibits this autoimmune potential. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 3, p. 627-633, Mar. 1993.
- 86 FOWLKES, B.J.; RAMSDELL, F. T-cell tolerance. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, n. 6, p. 873-879, Dec. 1993.
- 87 FRANGIPANE, L.G.; BARKER, C.F.; SILVERS, W.K. Importance of weak histocompatibility factors in survival of pancreatic islet transplants. **Surgical Forum**, v. 28, p. 294-296, 1977.
- 88 FRANKLIN, W.A.; SCHULAK, J.A.; RECKARD, C.R. The fate of pancreatic islets in rats. **American Journal of Pathology**, v. 94, n. 1, p. 85-95, Jan. 1979.
- 89 FUKUZAKI, T.; GOTOH, M.; MONDEN, M. et al. Induction of tolerance to islet allografts with preoperative donor spleen cell injection and a short course of FK506 treatment. **Transplantation Proceedings**, v. 23, n. 6, p. 3221-3222, Dec. 1991.
- 90 FUKUZAKI, T.; GOTOH, M.; MONDEN, M. et al. Induction of unresponsiveness to islet allograft by preoperative donor spleen cell injection and FK506 treatment. **Transplantation Proceedings**, v. 25, n. 1, p. 975, Feb. 1993.
- 91 GAINER, A.L.; KORBUTT, G.S.; RAJJOTE, R.V. et al. Expression of CTLA4-Ig by biolistically transfected mouse islets promotes islet allograft survival. **Transplantation**, v. 63, n. 7, p. 1017-1044, Apr. 1997.
- 92 GAO, Z.; ZHONG, R.; JIANG, J. et al. Adoptively transferable tolerance induced by CD45RB monoclonal antibody. **Journal of the American Society of Nefrology**, v. 10, n. 2, p. 374-381, Feb. 1999.
- 93 GAYET, R.; GUILLAUMIE, M. La regulation de la sécrétion interne pancreatique par un processus humoral, démontrée par des transplantations de pancréas. Expériences sur des animaux dépancreatés. **Compte Rendus de la Société de Biologie de Paris**, v. 97, p. 1615-1618, 1927.
- 94 GEORGAKAIS, A. Experimental pancreatic islets transplantation. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 59, p. 231-235, 1979.

- 95 GIMMI, C.D.; FREEMAN, G.J.; GRIBBEN, K. et al. B cell surface antigen B7 provides costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 15, p. 6575-6579, Aug. 1991.
- 96 GORER, P.A. The genetic and antigenetic basis of tumor transplantation. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 44, p. 691-697, 1937.
- 97 GOTOH, M.; MAKI, T.; KIYOIZUMI, T. et al. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. **Transplantation**, v. 40, n. 4, p. 437-438, Oct. 1985.
- 98 GRAY, B.N.; WATKINS, E. Prolonged relief after syngeneic or allogeneic transplantation of isolated pancreatic islets in rats. **Surgical Forum**, v. 25, n. 0, p. 382-384, 1974.
- 99 GUINAN, E.C.; GRIBBEN, J.G.; BOUSSIOTIS, V.A. et al. Pivotal role of the B7/CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. **Blood**, v. 10, n. 10, p. 3261-3282, Nov. 1994.
- 100 GUNTHER, U. CD44; a multitude of isoforms with diverse functions. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 184, p. 47-63, 1993.
- 101 HALL, B.M.; PEARCE, N.W.; GURLEY, K.E. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 1, p. 141-157, Jan. 1990.
- 102 HANCOCK, W.W.; SAYEGH, M.H.; KWOK, C.A. et al. Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation. **Transplantation**, v. 55, n. 5, p. 1112-1118, May 1993.
- 103 HANSEN, P.J.; MARTIN, P.J.; NOWINSKI, R.C. Monoclonal antibodies indentifying a novel T-cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. **Immunogenetics**, v. 10, p. 247-260, 1980.
- 104 HAO, L.; CALCINARO, F.; GILL, R.G. et al. Facilitation of specific tolerance induction in adult mice by RS-61443. **Transplantation**, v. 53, n. 3, p. 590-595, May 1992.
- 105 HARP, J.A.; EWALD, S.J. Modulation of in vitro immune responses by monoclonal antibody to T200 antigen. **Cellular Immunology**, v. 81, n. 1, p. 71-80, Oct. 1983.
- 106 HARPER, K.; BALZANO, C.; ROUVIER, E. et al. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 3, p. 1037-1044, Aug. 1991.

- 107 HARVATH, L.; BALKE, J.A.; CHRISTIANSEN, N.P. et al. Selected antibodies to leukocyte common antigen (CD45) inhibit human neutrophil chemotaxis. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 3, p. 949-957, Feb. 1991.
- 108 HAYNES, B.F.; TELEN, M.J.; HALE, L.PL. et al. CD44 – a molecule involved in leucocyte adherence and T-cell activation. **Immunology Today**, v. 10, n. 12, p. 423-428, Dec. 1989.
- 109 HELLESTROM, C. A method for microdissection of intact pancreatic islets of mammals. **Acta Endocrinologica**, v. 45, p. 122-132, 1964.
- 110 HELMKE, K.; SLIJEPCEVIC, M.; FEDERLIN, K. Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. Studies in allogeneic pancreatectomized rats. **Hormon and Metabolism Research**, v. 7, n. 6, p. 210-214, Nov. 1975.
- 111 HENRIKSSON, C. Isolation and transplantation of islets of Langerhans. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 483, p. 1-21, 1978.
- 112 HERING, B.J.; SCHULTZ, A.O.; GEIER, C. International islet transplant registry. **Newsletter**, v. 5, Jun. 1995.
- 113 HOLLANDER, G.A.; ZUKLYS, S; FORSTER, E. et al. On costimulatory signals and T cell tolerance : relevance for transplantation immunity. **Transplantation Proceedings**, v.31, p. 25S-32S, 1999.
- 114 HORGAN, K.J.; TANAKA, Y.; SHAW, S. Postthymic differentiation of CD4 T lymphocytes : naive versus memory subsets and further specialization among memory cells. **Chemical Immunology**, v. 54, p. 72-102, 1992.
- 115 HOUSE, E.L.; JACOBS, M.S.; PANSKY, B. Effect of pancreatic homografts on the blood of normal and diabetic hamsters. **Anatomy Rec**, v. 144, p. 259, 1962.
- 116 HUNTER, T. Protein tyrosin phosphatases : the other side of the coin. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1013-1016, Sept. 1989.
- 117 HUNTER, T.; COOPER, J.A. Protein-tyrosine-kinases. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 54, p. 897-930, 1985.
- 118 ISOBE, M.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. et al. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. **Science**, v. 255, n. 5048, p.1125-1127, Feb. 1992.
- 119 JALKANEN, S.; BARGATZE, R.F.; TOYOS, J. et al. Lymphocyte recognition of high endothelium; antibodies to distinct epitopes of an 85-95kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymphonode, mucosal or synovial endothelium cells. **Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 2, p. 983-990, Aug. 1987.

- 121 JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. **Immunobiology** : the immune system in health and disease. New York : Garland Publishing, 1999.
- 122 JINDAL, R.M.; SIDNER, R.A.; BOCHAN, M.R. et al. Clinical experience with autologus pancreatic islet transplantation. **Transplantation**, v. 67, n. 7, p. S172, 1999.
- 123 JUNE, C.H.; LEDBETTER, J.A.; LINSLEY, P.S. et al. Role of the CD28 receptor in T cell activation. **Immunology Today**, v. 11, n. 6, p. 211-216, June 1990.
- 124 JUNE, C.H.; BLUESTONE, J.A.; NADLER, L.M. et al. The B7 and CD28 receptor families. **Immunology Today**, v. 15, n. 7, p. 321-332, July 1994.
- 125 KANAI, T.; PORTER, J.; MONACO, A.P. et al. Successful treatment of experimental diabetes by sequential transplantations of multiple-donor allografts. **Transplantation**, v. 47, n. 1, p. 3-6, Jan. 1989.
- 126 KAUFMAN, D.B.; FIELD, M.J.; GRUBER, S.A. et al. Extended functional survival of murine islet allografts with 15-deoxyspergualin. **Transplantation Proceedings**, v.24, n. 3, p. 1045-1047, June 1992.
- 127 KEARNEY, E.R.; WALUNAS, T.L.; KARR, R.W. et al. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen specific CD4-T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA4. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1032-1036, Aug. 1995.
- 128 KELLY, K.; SHORTMAN, K.; SCOLLAY, R. The surface phenotype of activated T lymphocytes. **Immunology and Cell Biology**, v. 66, n. 4, p. 297-306, Aug. 1988.
- 129 KEMP, C.B.; KNIGHT, M.J.; SHARP, D.W. et al. Effect of transplantation site on the results of pancreatic isografts in diabetic rats. **Diabetologia**, v. 9, n. 6, p. 486-491, Dec. 1973.
- 130 KENNEDY, W.R.; NAVARRO, X.; GOETZ, F.C. et al. The effect of pancreas transplantation on diabetic neuropathy. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 15, p. 1031-1037, Apr. 1990.
- 131 KILLAR, L.; MACDONALD, G.; WEST, J. et al. Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4 (il-4)/B cells. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 6, p.1674-1680, Mar. 1987.
- 132 KIM, J.; WOODS, A.; BECKER, D.E. et al. Distinct functional phenotypes of cloned Ia-restricted helper T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 1, p. 188-201, July 1985.
- 133 KING, C.L.; STUPI, R.J.; CRAIGHEAD, N. et al. CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4 cells. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 2, p. 587-595, Feb. 1995.

- 134 KLAUSNER, R.D.; SAMELSON, L.E. T cell antigen receptor activation pathways : the tyrosine kinase connection. **Cell**, v. 64, n. 5, p. 875-878, Mar. 1991.
- 135 KOJA, S.; DOI, H.; SATOMI, S. et al. Induction of tolerance to islets and skin allografts by intrathymic inoculation of thymic stromal cells. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n.1-2, p. 765-766, Feb. 1997.
- 136 KONCS, L.; DAVIDOFF, L.; DELELLIS, R.A. et al. Quantitative aspects of the metabolic response to pancreatic islet transplantation in rats with severe ketotic diabetes. **Metabolism**, v. 25, n. 2, p. 147-156, Feb. 1976.
- 137 KORETSKI, G.A.; PICUS, J.; THOMAS, M.L. et al. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T cell antigen receptor to phosphatidyl inositol pathway. **Nature**, v. 346, n. 6279, p. 66-68, July 1990.
- 138 KORETZKY, G.A.; PICUS, J.; SCHULTZ, T. et al. Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD-2 mediated activation of protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2037-2041, Mar. 1991.
- 139 KORETZKY, G.A.; KOHMETSCHER, M.A.; KADLECK, T. et al. Restoration of T cell receptor-mediated signal transduction by transfection of CD45 cDNA into a CD45-deficient variant of the Jurkat T cell line. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 4, p. 1138-1142, Aug. 1992.
- 140 KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 631-664, 1985.
- 141 KOZIERADZKI, I.; KUNDIG, T.; KISHIHARA, K. et al. T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 7, p. 3130-3139, Apr. 1997.
- 142 KRAMP, R.C.; CUCHE, R.; RENOLD, A.E. et al. Subcutaneous isogeneic transplantation of either duct-ligated pancreas or isolated islets in streptozocin diabetic mice. **Endocrinology**, v. 99, n. 5, p. 1161-1167, Nov. 1976.
- 143 KRIEGER, N.R.; YIN, D.P.; GARRISON-FATHMAN, C. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 5, p.2013-2018, Nov. 1996.
- 144 KRUMMEL, M.F.; ALLISON, J.P. CD28 and CTLA4 deliver opposing signals which regulate the response of T cells to stimulation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 459-466, Aug. 1995.
- 145 KUPFER, A.; MOSMANN, T.R.; KUPFER, H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper t cells and splenic B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 3, p. 775-779, Feb. 1991.

- 146 KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.; WASOWSKA, B.; PAPP, I. CD4 mAb therapy modulates alloantibody production and intracaridac graft deposition in association with selective inhibition of Th1 lymphokines. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 9, p.5053-5061, Nov. 1993.
- 147 KUSSMAUL,A. Zur lehre vom Diabetes Mellitus. Uber eine eigenthumlivhe Todesart bei Diabetischen, uber Acetonämie. Glycerin-behandlung der Diabetes und Einspritzungen von Diastase ins Blut bei dieser Krankheit. **Deutsche Archieves fur Klinische Medizin**, v. 14, p. 1-46, 1874.
- 148 LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-39, Jan. 1967.
- 149 LAFERTY, K.J.; CUNNINGHAM, A.J. A new analysis of allogeneic interactions. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 27-37, Feb. 1975.
- 150 LAFERTY, K.J.; COOLEY, M.A.; WOOLNOUGH, J. et al. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. **Science**, v. 188, n. 4185, p. 259-261, Apr. 1975.
- 151 LAFERTY, K.J.; WOOLNOUGH, J. The origin and mechanism of the allograft reaction. **Immunology Review**, v. 35, p. 231-262, 1977.
- 152 LAFERTY, K.J.; WARREN, H.S.; WOOLNOUGH, J.A. et al. Immunological induction of T lymphocytes : role of antigen and the lymphocyte costimulator. **Blood Cells**, v. 4, n. 3, p. 395-399, 1978.
- 153 LAFERTY, K.J.; ANDRUS, L.; PROWSE, S.J. Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses. **Immunology Review**, v. 51, p. 279-314,1980.
- 154 LAKEY, J.R.T.; WARNOCK, G.L.; BRIERTON, M. et al. Development of an automated computed-controlled islet isolation system. **Cell Transplantation**, v. 6, n. 1, p. 47-57, Jan. 1997.
- 155 LAKKIS, F.; KONIECZNY, B.T.; LOWRY, R.P. CTLA4 Ig induces long-term cardiac allograft survival in the absence of interleukin-4. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, p. 1887-1892, 1996.
- 156 LANGERHANS, P. Uben einen drusen polyp im ileum. **Virchows Archives**, v. 28, p.559-565, 1867.
- 157 LANGERHANS, P. Uber die mikroskopische anatomie des pankreas. **Inalgural-Dissertation**. Berlin : Gustave Lange, 1869.
- 158 LARSEN, C.P.; ALEXANDER, D.Z.; HOLLENBAUGH, D. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection : supression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. **Transplantation**, v. 61, n. 1, p. 4-9, Jan. 1996.

- 159 LAZAROVITS, A.I.; POPPEMA, S.; WHITE, M.J. et al. Inhibition of alloreactivity in vitro by monoclonal antibodies directed against restricted isoforms of the leukocyte-common antigen (CD45). **Transplantation**, v. 54, n. 4, p. 724-729, Oct. 1992.
- 160 LAZAROVITS, A.I.; POPPEMA, S.; ZHANG, Z. et al. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. **Nature**, v. 380, n. 6576, p. 717-720, Apr. 1996.
- 161 LECHLER, R.I.; LOMBARDI, G.; BATCHELOR, J.R. et al. The molecular basis of alloreactivity. **Immunology Today**, v. 11, n. 3, p. 83-88, Mar. 1990.
- 162 LEDBETTER, J.A.; TONKS, N.K.; FISHER, E.H. et al. CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 22, p. 8628-8632, Nov. 1988.
- 163 LEE, W.T.; YIN, X.M.; VITTETA, E.S. Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 9, p. 3288-3295, May 1990.
- 164 LEFRANCOIS, L.; BEVAN, M.J. Functional modifications of cytotoxic T lymphocyte T200 glycoprotein recognized by monoclonal antibodies. **Nature**, v. 314, p. 449-452, n.6010, Apr. 1985.
- 165 LENSCHOW, D.J.; ZENG, Y.; THISTLETHWAITE, J.R. Long term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4 Ig. **Science**, v. 257, p. 789-792, n. 5071, Aug. 1992.
- 166 LENSCHOW, D.J.; SU, G.H.T.; ZUCKERMAN, L.A. et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11054-11058, Dec. 1993.
- 167 LENSCHOW, D.J.; HO, S.C.; SATTAR, H. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the non obese diabetic mouse. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 1145-1155, Mar. 1995.
- 168 LESLEY, I.; TROTTER, J.; HYMAN, R. The Pgp-1 antigen is expressed on early fetal thymocytes. **Immunogenetics**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 1985.
- 169 LEUNG, H.T.; BRADSHAW, J.; CLEAVELAND, J.S. et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motifs in its cytoplasmic tail. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 25107-25114, Oct. 1995.

- 170 LILLEHEI, R.C.; SIMMONS, R.L.; NAJARIAN, J.S. et al.. Pancreatic-duodenal allotransplantation : experimental and clinical experience. **Annals of Surgery**, v. 172, n. 3, p. 405-436, Sept. 1970.
- 171 LIM, L.C.; FIORDALISI, M.N.; MANTELL, J.L. et al. A whole blood assay for qualitative and semi quantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 3, p. 392-398, May 1998.
- 172 LINSLEY, P.S.; CLARK, E.A.; LEDBETTER, J.A. T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5031-5035, Jul. 1990.
- 173 LINSLEY, P.S.; BRADY, L.; GROSMIRE, A. et al. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 3, p. 721-730, Mar. 1991a.
- 174 LINSLEY, P.S.; BRADY, W.; URNES, M. et al. CTLA4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 3, p. 561-569, Sept. 1991b.
- 175 LINSLEY, P.S.; GREENE, J.L.; TAN, P. et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA4 and CD28 on activated T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 6, p. 1595-1604, Dec. 1992.
- 176 LINSLEY, P.S.; LEDBETTER, J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 191-212, 1993.
- 177 LINSLEY, P.S.; GREENE, J.L.; BRADY, W. et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v. 1, n. 9, p. 793-801, Dec. 1994.
- 178 LINSLEY, P.S.; BRADSHAW, J.; GREENE, J. et al. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. **Immunity**, v. 4, n. 6, p. 535-543, June 1996.
- 179 LIPMAN, M.L.; STEVENS, A.C.; STROM, T.B. Heightened intragraft cytotoxic lymphocyte gene expression in acutely rejecting renal allografts. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 10, p. 5120-5127, May 1994.
- 180 LORENZ, D.; PETERMANN, J.; BECKERT, R. et al. Transplantation of isologous islets of Langerhans in diabetic rats. **Acta Diabetologica Latina**, v. 12, n. 1, p. 30-40, 1975.

- 181 MACATONIA, S.E.; DOHERTY, T.M.; KNIGHT, S.C. et al. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN γ production. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3755-3765, May 1993.
- 182 MACDONALD, H.R.; BUDD, R.C.; CEROTTINI, J.C. Pgp-1 (Ly 24) as a marker of murine memory T lymphocytes. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 159, p. 97-109, 1990.
- 183 MACFARLANE, I.A.; BLISS, M.; JACKSON, J.G.L. et al. The history of diabetes mellitus. In: PICKUP, J.; WILLIAMS, G. **Textbook of diabetes**. London : Blackwell Science, 1997. v. 1, p. 1.1-1.21.
- 184 MARCHIORO, T.L.; AXTELL, H.K.; LA VIA, M.F. et al. The role of adrenocortical steroids in reversing established homograft rejection. **Surgery**, v. 55, p. 412-417, 1964.
- 185 MARQUET, R.I.; HEYSTEK, G.A. The effect of immunosuppressive treatment on the survival of allogeneic islets of Langerhans in rats. **Transplantation**, v. 20, n. 5, p. 428-431, Nov. 1975.
- 186 MCMICHAEL, A.J. **Leukocyte typing III**. Oxford : Oxford University Press, 1987.
- 187 MEDAWAR, P.B. The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. **Journal of Anatomy**, v. 78, p. 176-199, 1944.
- 188 MEEKER, W.R.; CONDIE, R.; WEINER, D. et al. Prolongation of skin homograft survival in rabbits by 6-mercaptopurine. **Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine**, v. 102, p. 459-461, 1959.
- 189 MERWE, P.A.; BODIAN, D.L.; DAENKE, S. et al. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 3, p. 393-403, Feb. 1997.
- 190 METTLER, C.C. **History of medicine**. Philadelphia : Blackiston, 1947. p. 125-183.
- 191 METZ, D.P.; FARBER, D.L.; TAYLOR, T. et al. Differential role of CTLA-4 in regulation of resting versus naive CD4 T cells activation. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 1, p. 5855-5861, Dec. 1998.
- 192 MEYER, J. Sur la signification physiologique de la sécrétion interne du pancréas. **Zbl Physiologie**, v. 18, p. 826, 1904.
- 193 MICHAELSON, J.; SCHEID, M.; BOYSE, E.A. Biochemical features of Ly-5 alloantigen. **Immunogenetics**, v. 9, p. 193-199, 1979.
- 194 MINTY, A.; CHALDON, P.; DEROCQ, J.M. et al. D. Interleukin-13 is a new lymphokine regulating inflammatory immune responses. **Nature**, v. 362, n. 6417, p. 248-250, Mar. 1993.

- 195 MITLER, R.S.; GREENFIELD, R.S.; SCHACTER, B.Z. et al. Antibodies to the common leukocyte antigen T200 inhibit an early phase in the activation of resting human B cells. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 10, p. 3159-3166, May 1987.
- 196 MIYAKE, K.; UNDERHILL, C.B.; LESLEY, J. et al. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 1, p. 69-75, July 1990.
- 197 MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. **General and Comparative Endocrinology**, v. 5, p. 342-353, 1965.
- 198 MOSMAN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- 199 MOSMAN, T.R.; COFFMAN, R.L. Two types of mouse helper T cell clone : implications for immune regulation. **Immunology Today**, v. 8, p. 223-227, 1987.
- 200 MUELLER, D.L.; JENKINS, M.K.; SCHWARTZ, R.H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation : a costimulatory pathway determines the outcome of T cell occupancy. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 445-489, 1989.
- 201 NAJI, A. Induction of tolerance by intrathymic inoculation of alloantigen. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 5, p. 704-709, Oct. 1996.
- 202 NASH, J.R.; PETERS, M.; BELL, P.R.F. Comparative survival of pancreatic islets, heart, kidney and skin allografts in rats, with and without enhancement. **Transplantation**, v. 24, n. 1, p. 70-73, July 1977.
- 203 NELKEN, D.; FRIEDMAN, E.A.; MORSE, S.I. et al. Islets of Langerhans allotransplantation in the rat. **Transplantation Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 333-336, Mar. 1977.
- 204 NICKERSON, P.; STEIGER, J.; ZHENG, X.X. et al. Manipulation of cytokine networks in transplantation. **Transplantation**, v. 63, n. 4, p. 489-494, Feb. 1997.
- 205 NOELLE, R.J.; LEDBETTER, I.A.; ARUFO, A. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. **Immunology Today**, v. 13, n. 11, p. 431-433, Nov. 1992.
- 206 NORMAN, D.J. Mechanisms of action and overview of OKT3. **Therapy and Drug Monitoring**, v. 17, n. 6, p. 615-620, Dec. 1995.
- 207 NOSSAL, G.J.V. Negative selection of lymphocytes. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 229-240, Jan. 1994.

- 208 O'CONNEL, P.J.; PACHECO-SILVA, A.; NICKERSON, P.W. et al. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 1, p. 1093-1094, Feb. 1993.
- 209 ODONERA, H.; MOTTOS, D.G.; KORETZKY, G.A. et al. Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of slp-76 to vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22225-22230, Sept. 1996.
- 210 PAETKAU, V.; MILLS, G.; GERHART, S. et al. Proliferation of murine thymic lymphocytes in vitro is mediated by concavalin A-induced release of lymphokine (costimulator). **The Journal of Immunology**, v. 117, n. 4, p. 1320-1324, Oct. 1976.
- 211 PANIJAYANOND, P.; SOROFF, H.S.; MONACO, A.P. Pancreatic islet isograft in mice. **Surgical Forum**, v. 24, p. 329-331, 1973.
- 212 PANKEWYCZ, O.; MACKIE, J.; HASSARJIAN, R. et al. Interleukin-2-diphtheria toxin fusion protein prolongs murine islet cell engraftment. **Transplantation**, v. 47, n. 2, p. 318-322, Feb. 1989.
- 213 PARKER, D.C.; GREINER, D.L.; PHILLIPS, N.E. et al. Survival of mouse pancreatic islets allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 21, p. 9560-9564, Oct. 1995.
- 214 PINGEL, J.T.; THOMAS, M.L. Evidence that the leucocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1055-1065, Sept. 1989.
- 215 PIPELEERS-MARICHAL, M.; PIPELEERS, D.G.; CUTLER, J. et al. Metabolic and morphologic studies in intraportal islet transplanted rats. **Diabetes**, v. 25, n. 11, p. 1041-1051, Nov. 1976.
- 216 POO, W.J.; CONRAD, L.; JANEWAY, C.A. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. **Nature**, v. 332, n. 6162, p. 378-380, Mar. 1988.
- 217 POSSELT, A.M.; BARKER, C.F.; TOMASZEWSKI, J.E. et al. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. **Science**, v. 249, n. 4974, p. 1293-1295, Sept. 1990.
- 218 POWRIE, F.; LEACH, M.; MAUZE, S. et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. **Intern Immunology**, v. 5, n. 11, p. 1461-1471, Nov. 1993.

- 219 POWRIE, F.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MAUZE, F. et al. Regulatory interactions between CD45RB high and CD45RB low CD4+ Tcells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 2, p. 589-600, Feb. 1994.
- 220 PRICKETT, T.C.R.; HART, D.N.J. Anti-leukocyte common (CD45) antibodies inhibit dendritic cell stimulation of CD4 and CD8 T lymphocyte proliferation. **Immunology**, v. 69, n. 2, p. 250-256, Feb. 1990.
- 221 PROWSE, S.J.; LAFFERTY, K.J.; SIMEONOVIC, C.J. The reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation. **Diabetes**, v. 31, s.4, p. 30-38, Aug. 1982.
- 222 PUNT, J.A.; SINGER, A. T cell development. In: RICH, R.R.; FLEISHER, T.A.; SCHWARTZ, B.D. et al. **Clinical immunology : principles and practice**. Saint Louis : Mosby, 1996. p. 176-191.
- 223 RABINOVITCH, A.; MULLER, W.A.; VASTUTIC, F. et al. Pancreatic isotransplantation. Influence of severity of diabetes in the recipient. **Diabetologia**, v. 12, p. 415, 1976.
- 224 RASTELLINI, C.; SALAM, A.; KUDDUS, R. et al. Mechanisms underlying the development of T-cell tolerance following Interruption of signaling at the CD28/B7 and CD40/gp39 interface. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n. 1-2, p. 845, Feb. 1999b.
- 225 RASTELLINI, C.; SALAM, A.; KUDDUS, R. et al. Prevention of T cell activation by rhCTLA-4 Ig and anti-CD40L monoclonal antibody results in indefinite islet allograft survival. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n. 1/2, p. 1242-1243, Feb. 1999a.
- 226 REA, I.M.; MCNERLAN, S.E.; ALEXANDER, H.D. CD69, CD25 and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alfa, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 1, p. 79-93, Jan. 1999.
- 227 REBELLATO, L.M.; GROSS, U.; VERBANAC, K.M. et al. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. **Transplantation**, v. 57, n. 5, p. 685-694, Mar. 1994.
- 228 RECKARD, C.R.; ZEIGLER, M.M.; BARKEWR, C.F. Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. **Surgery**, v. 74, n. 1, p. 91-99, July 1973.
- 229 RECKARD, C.R.; FRANKLIN, W.; SCHULAK, J.A. Intraesplenic, vs intraportalpancreatic islet transplantation : Quantitative, qualitative and immunological aspects. **Transactions of the American Society of Artificial Intern Organs**, v. 24, p. 231-234, 1977.

- 230 REECE-SMITH, H.; DUTOIT, D.F.; MCSHANE, P. et al. Effect of cyclosporin A on rejection of pancreatic islets transplanted under the renal capsule. **Transplantation**, v. 32, n. 4, p. 333-334, Oct. 1981.
- 231 RISSO, A.; SMILOVICH, D.; CAPRA, M.C. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 12, p. 4105-41014, June 1991.
- 232 ROBERTSON, R.P.; SUTHERLAND, D.E.R.; LANZ, K.J. Restored insulin secretion and euglycemia in type I diabetes a decade and more after successful pancreas transplantation. **Transplantation**, v. 67, n. 7, p. S172, Apr. 1999.
- 233 ROLLO, J. **An account of two cases of the diabetes mellitus, with remark as they arose during the progress of cure.** London : C. Dilly, 1797.
- 234 ROSSINI, A.A.; PARKER, D.C.; PHILLIPS, N.E. et al. Induction of immunological tolerance to islets allografts. **Cell Transplantation**, v. 5, n. 1, p. 49-52, Jan. 1996.
- 235 RUMPF, D.; LOHLEIN, D.; PICHALMAYR, R. Multiple transplantation of islets of Langerhans. **European Surgical Research**, v. 9, n. 6, p. 403-410, 1977.
- 236 SADIC, M.D.; HEINZEL, F.P.; HOLADAY, B.J. et al. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody : evidence for a T cell dependent interferon- γ -independent mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 1, p. 115-123, Jan. 1990.
- 237 SANDERS, M.E.; MAKGOBA, M.W.; SHARROW, S.O. et al. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCH21, CDW29, and Pgp-10 and have enhanced IFN- γ production. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 5, p. 1401-1407, Mar. 1988.
- 238 SANTIS, A.G.; CAMPANERO, M.R.; ALONSO, J.L. et al. Tumor necrosis factor α production induced in T lymphocytes through the AIM-CD69 activation pathway. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 5, p. 1253-1259, May 1992.
- 239 SARMIENTO, M.; LOKEN, M.R.; TROWBRIDGE, I.S. et al. High molecular weight lymphocyte surface proteins are structurally related and are expressed on different cell populations at different times during lymphocyte maturation and differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 128, n. 4, p. 1676-1684, Apr. 1982.
- 240 SAYEGH, M.H.; AKALIN, E.; HANCOCK, W.W. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 5, p. 1869-1874, May 1995.

- 241 SAYEGH, M.H.; TURKA, L.A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 25, p. 1813-1821, June 1998.
- 242 SCHREIBER, S.L.; CRABTREE, G.R. The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. **Immunology Today**, v. 13, p. 136-142, 1992.
- 243 SCHWARTZ, R.H. Costimulation of T lymphocytes : the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1065-1068, Dec. 1992.
- 244 SEDER, R.A.; GERMAIN, R.N.; LINSLEY, P.S. et al. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 299-304, Jan. 1994.
- 245 SELAWRY, H.; HARRISON, J; PATIPA, M. Pancreatic islet isotransplantation : effects of age and organ culture of donors islets on reversal of diabetics in rats. **Diabetes**, v. 27, n. 6, p. 625-631, June 1978.
- 246 SELE, W.A. Studies on pancreatic grafts made with a new technique. **American Journal of Physiology**, v. 11, p. 118, 1935.
- 247 SHAPIRO, M.E.; LIU, M. Prolongation of islet allograft survival by anti-CD45 antibody pretreatment. **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 1, p. 613-614, Feb. 1995.
- 248 SHIRATORI, T.; MIYATAKE, S.; OHNO, H. et al. Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. **Immunity**, v. 6, n. 5, p. 583-589, May 1997.
- 249 SHIZURU, J.A.; GREGORY, A.K.; CHAO, T.B. et al. Islet allograft survival after a single course of treatment of recipient with antibody to L3T4. **Science**, v. 237, n. 4812, p. 278-280, July 1987.
- 250 SILBERBERG, R.; HIRSHBERG, G.E.; LESKER, P. Enzyme studies in the articular cartilage of diabetic rats and of rats bearing transplanted pancreas. **Diabetes**, v. 26, n. 8, p. 732-735, Aug. 1977.
- 251 SIMENOVIC, C.J.; BOWEN, K.M.; KOTLARSKI, I. et al. Modulation of tissue immunogenicity by organ culture. **Transplantation**, v. 30, p. 174-179, 1980.
- 252 SINGER, C. **A short history of anatomy from the Greeks to Harvey**. New York : Dove Publications, 1957. p. 111.
- 253 SINGER, S.J. Intercellular communication and cell-cell adhesion. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1671-1677, Mar. 1992.

- 254 SLIJEPCEVIC, M.; HELMKE, K.; FEDERLIN, K. Islet transplantation in experimental diabetes in the rat. Studies in allogeneic streptozotocin-treated rats. **Hormon and Metabolic Research**, v. 7, n. 6, p. 456-461, Nov. 1975.
- 255 SMITH, C.W. Cellular adhesion and interaction. In: RICH, R.R.; FLEISHER, T.A.; SCHWARTZ, B.D. et al. **Clinical immunology** : principles and practice. Saint Louis : Mosby, 1996. p. 176-191.
- 256 SNELL, G. The homograft reaction. **Annual Review of Microbiology**, v. 2, p. 439-457, 1957.
- 257 STAMENKOVIC, I.; SGROI, D.; ARUFFO, A. et al. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45R0 on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. **Cell**, v. 66, n. 6, p. 1133-1144, Sept. 1991.
- 258 STANDRING, R.; MACMASTER, W.R.; SUNDERLAND, C.A. et al. The predominant heavily glycosylated glycoproteins at the surface of rat lymphoid cells are differentiation antigens. **European Journal of Immunology**, v. 8, n. 12, p. 832-837, Dec. 1978.
- 259 STARZL, T.E.; TODO, S.; FUNG, J. et al. FK506 for human liver, kidney, and pancreas transplantation. **Lancet**, v. 2, n. 8670, p. 1000-1004, Oct. 1989.
- 260 STEURER, W.; NICKERSON, P.W.; STEELE, A.W. et al. Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1165-1174, Aug. 1995.
- 261 STONE, H.B.; OWINGS, J.C.; GEY, G.O. Transplantation of living grafts of thyroid and parathyroid glands. **Annals of Surgery**, v. 100, p. 613-628, 1934.
- 262 STRATTA, R.J.; TAYLOR, R.J.; GILL, I.S. Pancreas transplantation : a managed cure approach to diabetes. **Current Problems in Surgery**, v. 33, n. 9, p. 709-808, Sept. 1996.
- 263 STREULI, M.; MORIMOTO, C.; SCHRIEBER, M. et al. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 11, p. 3910-3914, Dec. 1988.
- 264 SUNDERLAND, C.A.; MCMASTER, W.R.; WILLIAMS, A.F. Purification with monoclonal antibodies of a predominant leucocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes. **European Journal of Immunology**, v. 9, p. 150-155, 1992.
- 265 SURH, C.D.; SPRENT, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. **Nature**, v. 372, n. 6501, p. 100-103, Nov. 1994.

- 266 SUTHANTHIRAN, M.; STROM, T.B. Renal transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 6, p. 365-376, Aug. 1994.
- 267 SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet cell transplantation : now and then. **Transplantation Proceedings**, v. 28, n. 4, p. 2131-2133, Aug. 1996.
- 268 SUTHERLAND, D.E.R. Pancreas and islet transplantation. I. Experimental studies. **Diabetologia**, v. 20, n. 3, p. 161-185, Mar. 1981.
- 269 SUTHERLAND, D.E.R.; MATAS, A.J.; NAJARIAN, J. Pancreatic islet transplantation. **Surgical Clinics of North America**, v. 58, n. 2, p. 365-390, Apr. 1978.
- 270 SWAIN, S.L. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. **Immunity**, v. 1, n. 7, p. 543, Oct. 1994.
- 271 SWAIN, S.L.; BRADLEY, L.M. Helper T cell memory : more questions than answers. **Seminars in Immunology**, v. 4, n. 1, p. 59-69, Feb. 1992.
- 272 SWAIN, S.L.; BRADLEY, L.M.; CROFT, M. et al. Helper T cell subsets : phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. **Immunology Review**, v. 123, p. 115-144, Oct. 1991.
- 273 SWAIN, L.S.; CROFT, M.; DUBEY, C. et al. From naive to memory T cells **Immunology Review**, v. 150, p. 143-167, Apr. 1996.
- 274 SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M. et al. IL-4 directs the development of Th-2 like helper effectors. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 11, p. 3796-3804, Dec. 1990.
- 275 TAKEUCHI, T.; LOWRY, R.P.; KONIECZNY, B. Heart allografts in murine systems : the differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. **Transplantation**, v. 53, n. 6, p. 1281-1294, June 1992.
- 276 TERRY, L.A.; BROWN, M.H.; BEVERLEY, P.C.L. The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180000MW component of the human leucocyte-common antigen, CD45. **Immunology**, v. 64, n. 2, p. 331-336, June 1988.
- 277 TESTI, R.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular (Ca++) and stimulation of protein kinase C. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 6, p. 1854-1860, Mar. 1989.
- 278 THEZE, J.; ALZARI, P.M.; BERTOGLIO, J. Interleukin-2 and its receptors; recent advances and new immunological functions. **Immunology Today**, v. 10, n. 10, p. 481-486, Oct. 1996.

- 279 TITE, J.P.; FOELMER, H.G.; MADRI, J.A. Inverse Ir gene control of the antibody and T cell proliferation responses to human basement membrane collagens. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 9, p. 2892-2898, Nov. 1987.
- 280 TIVOL, E.A.; BORRIELO, F.; SCHWEITZER, A.N. et al. Loss of CTLA4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA4. **Immunity**, v. 3, p. 541-547, 1995.
- 281 TOLEDO-PEREYRA, L.H.; BANDLIEN, K.A.; GORDON, D.A. et al. Renal subcapsular islet cell transplantation. **Diabetes**, v. 33, n. 9, p. 910-914, Sept. 1984.
- 282 TONKS, N.K.; DILTZ, C.D.; FISCHER, E.H. Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 263, n. 14, p. 6731-6737, May 1988.
- 283 TRAN, M.P.; LARSEN, J.L.; DUCKWORTH, W.C. et al. Anti-insulin antibodies are a cause of hypoglycemia following pancreas transplantation. **Diabetes Care**, v. 17, n. 9, p. 988-993, Sept. 1994.
- 284 TRAN, H.M.; NICKERSON, P.W.; RESTIFO, A.C. et al. Distinct mechanisms for the induction and maintenance of allograft tolerance with CTLA-Fc treatment. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 5, p. 2232-2239, Sept. 1997.
- 285 TRIMBLE, E.R.; KARAKASH, C.; MALAISSE-LAGAE, F. et al. Effects of intraportal islet transplantation on the transplanted tissues and the recipient pancreas. I. Functional studies. **Diabetologia**, v. 29, n. 5, p. 341-347, May 1980a.
- 286 TRIMBLE, E.R.; SIEGEL, E.G.; BERTHOUD, H.R. et al. Intraportal islet transplantation : functional assessment in conscious unrestrained rats. **Endocrinology**, v. 106, n. 3, p. 791-797, Mar. 1980b.
- 287 TROWBRIDGE, I. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 35, p. 23517-23520, Dec. 1991.
- 288 TROWBRIDGE, I. Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein, T200. **Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 1, p. 313-323, July 1978.
- 289 TROWBRIDGE, I.; MAZAUSKAS, J. Immunological properties of murine thymus-dependent lymphocyte surface glycoproteins. **European Journal of Immunology**, v. 6, n. 8, p. 557-562, Aug. 1976.
- 290 TROWBRIDGE, I.S.; THOMAS, M.L. CD45 : an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 85-116, 1994.

- 291 TURKA, L.A.; LINSLEY, P.S.; LIN, H. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 11102-11105, Nov. 1992.
- 292 TZE, W.J.; TAI, J. Successful intracerebral allotransplantation of pancreatic endocrine cells in spontaneously diabetic BB rats without immunosuppression. **Metabolism**, v. 33, n. 9, p. 785-789, Sept. 1984.
- 293 VAN DER VLIET, J.A.; NAVARRO, X.; KENNEDY, W.R. The effect of pancreas transplantation on diabetic polyneuropathy. **Transplantation**, v. 45, n. 2, p. 368-370, Feb. 1988.
- 294 VELASCO, A.; HENDRICKS, L.; MOREMEN, K.W. et al. Cell type dependent variation in the subcellular distribution of α -mannoridase I and II. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 39-51, July 1993.
- 295 VELLA, J.P.; SPADAFORA-FERREIRA, M.; MURPHY, B. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex alloptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. **Transplantation**, v. 64, n. 6, p. 795-800, Sept. 1997.
- 296 VESELY, D.L.; SELAWRY, H.; LEVEY, G. Correction of decreased guanylate cyclase activity in diabetic rats by pancreatic islet transplantation. **Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 403-405, June 1979.
- 297 VIALETTES, B.; LASSMAN, V.; VAGRE, P. et al. Islet transplantation in diabetic rats. Long term follow-up of glucose tolerance. **Acta Diabetologica Latina**, v. 16, n. 1, p. 1-8, Jan. 1979a.
- 298 VIALETTES, B.; SUTHERLAND, D.E.R.; MATAS, A.J. et al. Amelioration of streptozocin induced diabetes in rats : effect of islet isograft on plasma lipids and other metabolic abnormalities according to donor source and site of transplantation. **Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 489-494, May 1979b.
- 299 VON MERING, J.; MINKOWSKI O. Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. **Archives fur Experimentelle Pathologische und Pharmacie**, v. 26, p. 371-387, 1890.
- 300 WAAL, M.R.; HAANEN, J.; SPITS, H. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 915-924, Oct. 1991.
- 301 WALUNAS, T.L.; LENSCHOW, D.J.; BAKKER, C.Y. et al. CTLA4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**, v. 1, p. 405-413, 1994.

- 302 WAR, G.W.; MARCHALONIS, J.J. Glycoproteins of murine thymocyte and splenocyte surface membranes : binding to concavalin A and recognition by heterologous antilymphocyte serum. **Immunochemistry**, v. 13, p. 753-758, 1976.
- 303 WARNKE, R.A.; LINK, M.P. Identification and significance of cell markers in leukemia and lymphoma. **Annual Review of Medicine**, v. 34, p. 117-131, 1983.
- 304 WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J.M.; TIMMS, E. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA4. **Science**, v. 270, n. 5238, p. 9850-9880, Nov. 1995.
- 305 WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; SWAIN, S.L. Distinct regulation of lymphokine production is found in fresh versus in vitro primed murine helper T cell. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 5, p. 1800-1806, Mar. 1990.
- 306 WEISS, A. T cell antigen receptor signal transduction : a tale of tails and cytoplasmatic protein-tyrosine-kinases. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 1-7, Apr. 1993.
- 307 WHIPPLE, A.O. Present-day surgery of the pancreas. **New England Journal of Medicine**, v. 226, p. 515-526, 1942.
- 308 WILLEFORD, D.M.; HOFFMAN, P.A.; GALLATIN, W.M. Expression of lymphocyte adhesion receptors for high endothelium in primates. Anatomic partitioning and linkage to activation. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 10, p. 3416-3422, May 1989.
- 309 WILLIS, T. **Pharmaceutica rationalesive diatriba de medicamentorum operationitus in humano corpore**. London : [s.n.], 1675.
- 310 YOUNOSZAI, R.; SORENSON, R.L.; LINDAL, A.W. Homotransplantation of isolated pancreatic islets. **Diabetes**, v. 19, p. 406, 1970.
- 311 ZHENG, X.X.; MARKEES, T.G.; HANCOCK, W.W. et al. CTLA4 signals required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 8, p. 4983-4990, Apr. 1999.
- 312 ZHENG, X.X.; SAYEGH, M.H.; ZHENG, X.G. et al. The role of donor and recipient B7-1 (CD80) in allograft rejection. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 3, p. 1169-1173, Aug. 1997.
- 313 ZIEGLER, M.M.; RECKARD, C.R.; BARKER, C.F. Long term metabolic and immunologic considerations in transplantation of pancreatic islets. **Journal of Surgical Research**, v. 16, n. 6, p. 575-581, June 1974.